Berlijn 1976

R. Morgenstern.

ZUR BESTIMMUNG DER SCHEINBAREN DISSOZIATIONS-KONSTANTEN VON AGONISTEN AM PHARMAKOLOGISCHEN REZEPTOR DES GLATTEN MUSKELS

(Eine neue Methode der Dissoziationskonstanten-bestimmung für Agonisten ohne Verwendung von Antagonisten, verbunden mit einer kritischen Betrachtung der sogenannten klassischen irreversiblen Antagonisten)

D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der
Medizinischen Fakultät des Wissenschaftlichen Rates
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Rudolf Morgenstern
geb. am 7. 3. 1946 in Frankenberg

Dekan: Prof. Dr. sc. med. G. Ließ
Gutachter: 1. Prof. Dr. sc. med. W. Oelßner
2. Prof. Dr. sc. med. F. Jung
3. Prof. Dr. med. habil. H. Banasdiak

Berlin, den 20. 02. 1976 Verteidigung: 22.6.76

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Theoretischer Teil	4
2.1.	Rezeptortheorien	4
2.1.1.	Okkupationstheorie	5
2.1.2.	Geschwindigkeitstheorie	11
2.1.3.	Die Rezeptortheorie unter dem Aspekt wechselnder Konformationszustände, kooperativer Wechselwirkung und chemischer Modifikation der Rezeptorproteine	17
2.2.	Bestimmung von scheinbaren Dissoziationskonstanten	23
2.2.1.	Methode der Kombination equieffektiver Dosen	26
2.2.2.	Methode der Verwendung sogenannter "irreversibler kompetitiver" Antagonisten	28
2.2.3.	Methode der Verwendung von ß-Haloalkylaminen zur Umwandlung von partiellen Agonisten in kompetitive Antagonisten	30
2.2.4.	Methode des Vergleiches der Dosis-Wirkungs-Kurve eines partiellen Agonisten mit der eines starken Agonisten	31
2.2.5.	Bestimmung der Dissoziationskonstante von Agonisten durch Variation der extrazellulären Ca^{2+}-Konzentration	33
2.2.6.	Diskussion	

3.	Experimenteller Teil	38
3.1.	Eine neue Methode der Bestimmung der scheinbaren Dissoziationskonstante von Agonisten ohne Verwendung von Antagonisten	38
3.1.1.	Theoretischer Grundgedanke	38
3.1.2.	Material und Methodik	39
3.1.3.	Ergebnisse und Diskussion	43
3.2.	Zum allosterischen Angriff der ß-Haloalkylamine	45
3.2.1.	Theoretische Grundlagen	45
3.2.2.	Material und Methodik	48
3.2.3.	Ergebnisse und Diskussion	50
4.	Generaldiskussion	54
5.	Zusammenfassung	59

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547617_0001

Verwendete Symbole:

$[Ph]$	Pharmakonkonzentration
$[A]$	Agonist-Konzentration
$[P]$	Konzentration des partiellen Agonisten
$[B]$	Konzentration des kompetitiven Antagonisten
$[R]$	Rezeptorkonzentration
$[R]_T$	totale Rezeptorkonzentration
$[R]_A$	Rezeptorkonzentration in Konformationszustand A (=aktiv)
$[R]_i$	Rezeptorkonzentration in Konformationszustand i (=inaktiv)
$[PhR]$	Konzentration der Pharmakon-Rezeptor-Komplexe
$[PhR]_A$	Konzentration der Pharmakon-Rezeptor-Komplexe im Konformationszustand A (=aktiv)
$[PhR]_i$	Konzentration der Pharmakon-Rezeptor-Komplexe im Konformationszustand i (=inaktiv)
$[RA]$	Konzentration der Agonist-Rezeptor-Komplexe
K	Assoziations-Gleichgewichtskonstante (=Affinität)
K_D	Dissoziations-Gleichgewichtskonstante
K_A	Dissoziations-Gleichgewichtskonstante des Agonist-Rezeptor-Komplexes
K_P	Dissoziations-Gleichgewichtskonstante des partiellen Agonist-Rezeptor-Komplexes
K_B	Dissoziations-Gleichgewichtskonstante des kompetitiven Antagonist-Rezeptor-Komplexes
pA_x	negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des kompetitiven Antagonisten, unter deren Einwirkung $[A]$ x-fach erhöht werden muß, um den ursprünglich durch $[A]$ hervorgerufenen Effekt am Präparat zu erzielen.
p	Anteil der durch $[Ph]$ besetzten Rezeptoren
p_A	Anteil der durch $[A]$ besetzten Rezeptoren
p_P	Anteil der durch $[P]$ besetzten Rezeptoren

e	"efficacy" (173)
e_A	"efficacy" eines starken Agonisten
e_P	"efficacy" eines partiellen Agonisten
S	Stimulus (170), der durch $[A]$ oder $[B]$ auf das Präparat wirkt.
φ	Proportionalitätsfaktor zwischen chemischer Rezeptorstimulation und mechanischer Antwort (140)
ε	"intrinsic efficacy" (59)
A	Assoziationsgeschwindigkeit
k_1	Assoziationsgeschwindigkeitskonstante
k_2	Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante
$k_3 \ldots_6$	Geschwindigkeitskonstanten
E_A	durch $[A]$ hervorgerufener Effekt
E_M	am Präparat durch $[A]$ erreichbarer Maximaleffekt
E_A/E_M	Antwort des Präparats
r	"fade-ratio" (140)
$[Ca^{2+}]$	Konzentration der Ca^{2+}-Ionen
c	von extrazellulärer $[Ca^{2+}]$ abhängiger "efficiency factor" (63)
n_H	Hill-Koeffizient (=Analog der Dosis-Wirkungs-Kurve im Koordinatensystem $\log \frac{\% \text{ Effekt}}{100-\% \text{ Effekt}} = f(^{10}\log [m])$

1. Einleitung

Die Allgemeine Pharmakologie
genden und wesentlichen Prozesse, di
ktion von Pharmaka in Biosystemen ablaufen.
Unter diesen wesentlichen Prozessen ist die Reaktion der Pharmakonmoleküle mit den zum biologischen Effekt befähigten Systemen des Organismus, die ebenfalls auf molekularer Basis zu suchen sind (45, 69). Das Pharmakon ist dabei relativ einfach zu definieren, der biologische Reaktionspartner jedoch nicht.
Aus dieser Schwierigkeit heraus entstand zu Beginn des 20. Jahrhunderts das Konzept von den Rezeptoren (36, 42, 43, 49, 105), wobei als Rezeptor der molekulare Reaktionspartner des Pharmakons verstanden wird, der seitens des Biosystems befähigt ist, mit dem Pharmakonmolekül zu reagieren und als Folge dieser Reaktion eine Information auf das Biosystem zu übertragen, die zu einem biologischen Effekt führt.
Obwohl dieses Konzept (3, 4) schon viele Jahrzehnte alt ist, und heute kein Zweifel mehr an seiner Gültigkeit besteht, hat man wenig exaktes Wissen von den tatsächlichen Vorgängen an diesen Rezeptoren, ist man noch immer nicht in der Lage, einen solchen Rezeptor eindeutig und umfassend zu definieren.
Dieses Mangels bewußt, beschreiben die Rezeptortheorien allgemein die Vorgänge der Reaktion von Pharmaka mit diesen Rezeptoren, wobei, das Ganze komplizierend, die Registrierung von biologischen Effekten die Parameter liefert.
Ein wertender Überblick über die gegenwärtig diskutierte
gegeben, als Ausgangsbasis für die Überlegungen, die zu den vorgestellten Experimenten führten.

Entsprechend dem Konzept von den Rezeptoren als molekulare Reaktionspartner der Pharmakonmoleküle, spielt die Dissoziationskonstante der Reaktion zwischen Pharmakon und Rezeptor eine je nach Theorie mehr oder weniger fundamentale Rolle bei der Beschreibung der Wirkung von Pharmaka am Biosystem. In der Literatur wurden zur experimentellen Bestimmung dieser Dissoziationskonstante in vivo am isolierten Organ verschiedenartige Methoden beschrieben, die, obwohl unterschiedliche theoretische Prämissen benutzend, zu sehr ähnlichen Werten von Dissoziationskonstanten gelangen.
Diese Methoden werden ebenfalls im theoretischen Teil kurz vorgestellt und ihre Ergebnisse, die vorwiegend am Azetylcholinrezeptor des glatten Muskels gewonnen wurden, in Form einer Tabelle präsentiert.
Die formale Ähnlichkeit einiger dieser Verfahren, die zur Bestimmung von Agonist-Dissoziationskonstanten geeignet sind, führte zu dem Postulat, daß diese Verfahren auch mathematisch identisch sind. Dieses Postulat soll in der vorliegenden Arbeit überprüft werden. Erweist es sich als richtig, so müssen auch andere Verfahren, die auf dem gleichen Grundkonzept beruhen, vergleichbare Werte von Dissoziationskonstanten liefern.
Ein solches neu entwickeltes Verfahren wird in dieser Arbeit vorgestellt. Neben der experimentellen Beweisführung

darauf hin, daß die β-Haloalkylamine nicht "irreversibel kompetitiv", sondern "irreversibel allosterisch" das Rezeptorprotein hindern könnten.
Diese Befunde und Hinweise werden in der vorliegenden Arbeit in Form eines Modellversuches näher betrachtet. Läßt sich ein allosterischer Angriff beweisen, so muß das grundlegende Postulat FURCHGOTTs (5c), das zur Ableitung seiner "klassischen" Methode der Dissoziationskonstantenbestimmung eine Reduktion der totalen Rezeptor-

voraussetzt, verworfen werden.
Die neu entwickelte Methode der Dissoziationskonstantenbestimmung und ihre theoretische Begründung können beweisen, daß trotz des nicht zu bestätigenden Postulats die FURCHGOTT'sche Methode richtige Ergebnisse liefert.

2. Theoretischer Teil

2.1. Rezeptortheorien

Ein zentrales, allgemein-pharmakologisches Problem ist die Beziehung, die zwischen der Dosis eines in ein Biosystem applizierten Pharmakons und dem durch das Pharmakon ausgelösten Effekt besteht (175). Pharmaka, die in einem bestimmten Konzentrationsbereich eine mit steigender Konzentration zunehmende Wirkung am Biosystem hervorrufen, werden als Agonisten bezeichnet (3, 4).
Dagegen werden Pharmaka, die die Wirkungen solcher Agonisten abschwächen oder völlig unterdrücken, Antagonisten genannt. Die Antagonisten werden unterteilt in Substanzen, deren inhibitorische Wirkung durch steigende Agonistkonzentrationen gemindert wird (= kompetitive Antagonisten) und solche, die trotz steigender Agonistkonzentration weiterhin einen prozentualen Inhibitionseffekt entfalten (= nichtkompetitive Antagonisten) (11-13, 16).
Die graphische Darstellung der Funktion Effekt = f ([Phl) (164) liefert in einem halblogarithmischen Koordinatensystem für Agonisten S-förmig gekrümmte Kurven. Unter der Einwirkung von kompetitiven Antagonisten (35, 62, 64, 66, 67, 170 - 173, 176) werden diese Dosis-Wirkungs-Kurven auf der Abszisse nach rechts verschoben; die Anwesenheit nichtkompetitiver Antagonisten senkt die Agonist-Dosis-Wirkungs-Kurve prozentual ab (16). Abb. 1 zeigt eine Gegenüberstellung von kompetitivem und nichtkompetitivem Hemmtyp.

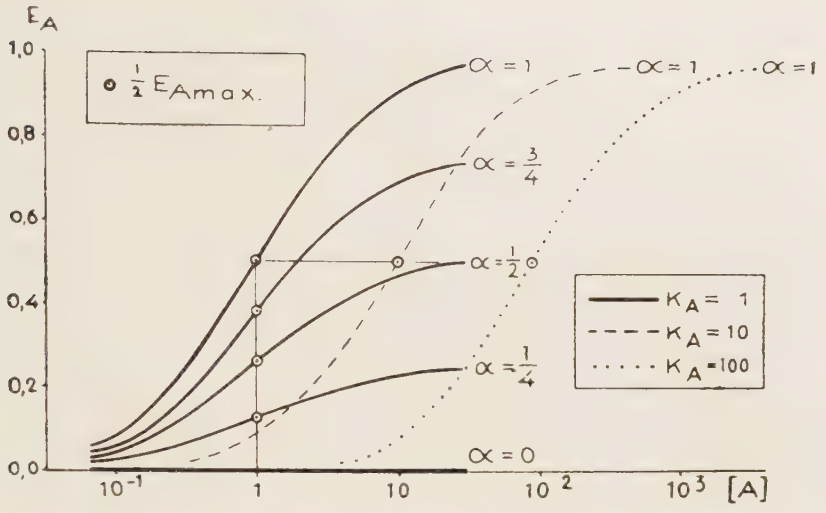


Abb. 1. Kompetitiver und nichtkompetitiver Hemmtyp (6)

Zur Beschreibung dieser Phänomene wurden Theorien entwickelt, die im folgenden zum Verständnis der Arbeit dargestellt werden sollen.

2.1.1. Okkupationstheorie

Die formale Ähnlichkeit der von LANGMUIR (106) gefundenen Beziehungen für die Adsorption von Gasen an Metalloberflächen mit den bei der Untersuchung der Wirkung von Acetylcholin oder Adrenalin an isolierten Organ gefundenen hyperbolischen Dosis-Wirkungs-Kurven veranlaßte **CLARK** (35-37), eine auf der Grundlage des MWG beruhende Theorie der [illegible] nicht nur die Wirkungen eines Agonisten am Rezeptor zu beschreiben, sondern auch, ausgehend von dem **Antagonismus** zwischen O_2 und CO am Hämoglobin (165, 117) [illegible] die bei der Kompetition von Ionen an Enzymen auftreten, erstmals den Antagonismus von Atropin gegenüber Azetylcholin (35) oder den Antagonismus von [illegible] (62-65, siehe auch 113, 165) mathematisch zu analysieren.

Nach CLARK (36) gehen Pharmaka mit hoher und selektiver Wirkung eine meist reversible Bindung mit Rezeptoren ein (47), die in großer Zahl auf der Zelloberfläche vorhanden sind.
Diese Theorie beschreibt die Wirkungsstärke eines Pharmakons allein auf der Grundlage seiner Affinität zum pharmakologischen Rezeptor. Sie setzt eine lineare Beziehung zwischen Rezeptorbesetzung und biologischem Effekt voraus. Mathematisch beschreibt CLARK (36) die Dosis-Wirkungs-Kurve folgendermaßen:

$$K \cdot [Ph] = \frac{D}{1-D} \qquad \text{Gl. (1)}$$

Der prozentuale Anteil der besetzten Rezeptoren ist danach dem prozentualen Effekt direkt proportional.
Die Assoziationskonstante entspricht der Pharmakonkonzentration, die 50 % des Maximaleffektes hervorruft.

$$K = \frac{1}{[Ph]} \qquad \text{Gl. (2)}$$

CLARK (36) betrachtete verschiedene Pharmakon-Gewebs-Systeme und fand, daß die Anstiege der Dosis-Wirkungs-Kurven bei vielen Systemen nicht Gl. (1) folgen. Nur an der Azetylcholin-Kontraktion des isolierten M. rectus abdominis des Frosches und an der durch Azetylcholin hervor- [illegible] von Frosch-Ventrikelstreifen konnte er eine eindeutige Übereinstimmung der experimentellen Daten mit Gl. (1) finden. WEBB (194) zeigte, daß auch hier bei Hemmung der Aze- [illegible] der Theorie entsprechen, sondern beträchtlich steiler verlaufen.

Die zunehmende Zahl an Beobachtungen, daß verschiedene Agonisten am gleichen Rezeptorsystem unterschiedlich starke Maximalwirkung hervorrufen (7), war Anlaß, die Okkupationstheorie etwa 20 Jahre nach CLARKs grundlegender Arbeit weitgehend zu modifizieren und zu ergänzen.
Das umfassendste Konzept lieferte STEPHENSON (175) mit folgenden drei Hypothesen:

(1) Ein Maximaleffekt kann durch einen Agonisten hervorgerufen werden, wenn dieser nur einen kleinen Anteil der Rezeptoren besetzt.

(2) Die Antwort (Effekt) ist nicht linear proportional der Zahl der besetzten Rezeptoren.

(3) Unterschiedliche Pharmaka können in unterschiedlichem Maße die Eigenschaft besitzen, einen Effekt hervorzurufen. Folglich können unterschiedliche Pharmaka einen unterschiedlichen Anteil an Rezeptoren besetzen, um gleiche Effekte hervorzurufen. Diese Eigenschaft des Pharmakons soll "efficacy" genannt werden.

Das STEPHENSON-Konzept, das [illegible] bis zu sehr großen Werten variieren kann, steht im Widerspruch zu CLARKs Alles-oder-Nichts-Reaktion (36).
Auch hängt die [illegible] nicht nur von [illegible] Affinität (2, 7-9, 14-16, 79, 162) zum Rezeptor, sondern auch von seiner "efficacy" ab. So kann ein Pharmakon hoher "efficacy" einen Maximaleffekt schon bei sehr kleiner Rezeptorbesetzung [illegible] Pharmakon sehr kleiner "efficacy" bei [illegible] Rezeptorbesetzung einen weit unter dem Maximum liegenden Effekt hervorrufen (24, 85, 178).
Pharmaka geringer bis fehlender "efficacy" werden als partielle Agonisten bezeichnet. Verbindungen mit einer "efficacy" von Null und einer Affinität zum Rezeptor sind kompetitive Antagonisten.

[illegible] (2, [illegible]16, 2[illegible], 1[illegible]) [illegible] "[illegible] activity" ist wesentlich [illegible] [illegible] sich der Theorie STEPHENSON (175) anschließen. ARIËNS (2, 7, 14-16) ordnet den wirksamsten Verbindungen (= vollständige Agonisten) eine intrinsische Aktivität von 1 zu. Partielle Agonisten haben eine intrinsische Aktivität von < 1, kompetitive Antagonisten eine solche von 0 ([illegible]).

$$\text{Intrinsische Aktivität} = \frac{\text{Effekt}_{(\text{Prüfsubstanz})}}{\text{Effekt}_{(\text{max.})}} \qquad \text{Gl. (3)}$$

Im Bereich einer "efficacy" zwischen Null und einem Wert, bei dem bei 100 %iger Rezeptorbesetzung gerade noch ein Minimaleffekt erreicht wird, entspricht die "efficacy" von STEPHENSON (175) der ARIËNSschen "intrinsic activity", wobei sich allerdings durch unterschiedliche Berechnungsverfahren unterschiedliche Zahlenwerte ergeben. VAN ROSSUM (160) führte deshalb 1966 neben der "intrinsic aktivity" α^E eine zweite "intrinsic activity" α^S ein.
Mathematisch formuliert STEPHENSON seine Modellvorstellungen folgendermaßen:

$$\frac{E_A}{E_M} = f(S) \qquad \text{Gl. (4)}$$

$$S = e \cdot p \qquad \text{Gl. (5)}$$

Durch Substitution von Gl. (1) in Gl. (5) folgt

$$S = e \cdot \frac{K \cdot [A]}{1 + K \cdot [A]} \qquad \text{Gl. (6)}$$

Für Pharmaka mit hoher "efficacy" wird K sehr klein gegenüber 1, und Gl. (6) reduziert sich auf

$$S = e \cdot K \cdot [A] \qquad \text{Gl. (7)}$$

Für eine 50 %ige Maximalantwort legt STEPHENSON (173) S = 1 fest. Eine Verbindung, die bei 100 %iger Rezeptorbesetzung nur 50 % des Maximaleffektes erreicht, hat demzufolge eine "efficacy" von e = 1, da Gl. (5). FURCHGOTT (59) führte den Begriff der "intrinsic efficacy" ($\mathcal{E}$) ein und wies nach, daß die STEPHENSONsche "efficacy" von der totalen Rezeptorkonzentration an einen entsprechenden Testpräparat abhängig ist. Für Gl. (5) kann man schreiben

$$\frac{E}{E_{max}} = f(\mathcal{E} \cdot [RA]) = f\left(\mathcal{E} \cdot \frac{[R]_T \cdot [A]}{[R]_T}\right) = f\left(e \cdot \frac{[RA]}{[R]_T}\right)$$

Gl. (9)

Aus Gl. (9) ersieht man, daß $\mathcal{E} \cdot [R]_T$ gleich STEPHENSONs e ist. Die "efficacy" e ist also von der Konzentration der aktiven Rezeptoren an einem bestimmten Präparat abhängig.

Im Gleichgewicht lautet das MWG:

$$\frac{[RA]}{[R]_T} = \frac{[A]}{K_A + [A]} \qquad \text{Gl. (10)}$$

Substituiert man Gl. (9) durch Gl. (10), so erh. [illegible]

[illegible]

Gl. (11)

Durch eine Reduktion von $[R]_T$ läßt sich K_A experimentell ermitteln. (Siehe dazu Abschnitt 2.2.)

2.1.2. Geschwindigkeitstheorie

GADDUM (62 - 64) beobachtete eine Diskrepanz zwischen den Geschwindigkeiten der Wirkung von Adrenalin und Ergotamin. Der Effekt des Antagonisten trat viel langsamer ein als der Effekt des Agonisten.
FURCHGOTT (57) bemerkte diese Diskrepanz ebenfalls und postulierte ein "Biophase-Modell" zur Erklärung dieses Phänomens.
1961 sah sich PATON (140) veranlaßt, für diese langsame Kinetik der Wirkung von Antagonisten und die Beobachtung, daß die Geschwindigkeit ihrer Wirkung sich umgekehrt zu ihrer Wirkungsstärke verhält, eine theoretische Erklärung zu finden. Weiterhin interessierte ihn die Tatsache, daß viele stimulierende Pharmaka einen Effekt hervorrufen, der zu einem Maximum ansteigt, dann aber mit der Zeit abfällt, obwohl das Pharmakon noch im Bad ist. In einigen Fällen scheint dieser Effektabfall unspezifisch zu sein, ähnlich dem Phänomen, das durch CANTONI und EASTMAN (27) oder ARIENS (6) beschrieben wurde; andere lassen sich nicht so einfach erklären (19, 142).
PATON (140) postulierte, daß die folgenden drei Phänomene
(1) die langsame Wirkung der Antagonisten (150, 159),
(2) die Beziehung der Geschwindigkeit der Hemmung der Antagonisten zu ihrer Wirkungsstärke und
(3) die abfallenden Antworten der Agonisten
erklärt werden könnten, wenn angenommen wird, daß nicht die Zahl der besetzten Rezeptoren die Größe der hervorgerufenen Antwort, sondern aber die Geschwindigkeit der Pharmaka-Rezeptor-Kombination (25) verantwortlich ist.
Die Geschwindigkeit, mit der sich ein Pharmakon mit dem Rezeptor verbindet, die Assoziationsgeschwindigkeit, ist definiert im Gleichgewicht:

man aber mit der Zeitkonstante $k_1 [Ph] + k_2$ zu einer Gleichgewichtsplateau $k_2 [Ph] / [Ph] + k_2 / k_1$ abfällt. Dieser Abfall wurde als "fade" bezeichnet (140). Bei unendlich großen Pharmakonkonzentrationen wäre die theoretische initiale Maximalantwort unendlich groß; gleichzeitig wäre dann auch der "fade"-Effekt unendlich schnell.
Das Verhältnis des Gleichgewichtsplateaus zum initialen Maximum wird als "fade-ratio" (140) bezeichnet.

$$f = \frac{k_2}{k_1 [Ph] + k_2} \qquad \text{Gl.(15)}$$

Nach der Okkupationstheorie ist $k_1 [Ph] + k_2$ ein Maß für die Anstiegszeit der Antwort; in der Geschwindigkeitstheorie bedeutet dieser Ausdruck die Zeit der Verringerung der Maximalantwort. Für alle Fälle, in denen k_2 nicht sehr groß gegenüber $k_1 [Ph]$ ist, sagt die Geschwindigkeitstheorie den "fade"-Effekt voraus. Dieser wird größer und schneller mit steigender Pharmakonkonzentration. Nach dem Auswaschen des Pharmakons nimmt der Effekt unmittelbar ab ($A \rightarrow 0$). Diese Abnahme ist nicht, wie in der Okkupationstheorie, von der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante abhängig. Begrenzend könnte sich aber die Diffusion aus dem Gewebe auswirken.
Während die Okkupationstheorie nur das Verhältnis $k_2 / k_1 = K_D$ bestimmt, kann [illegible] als "Affinität" eines Pharmakons [illegible] werden, macht es die Geschwindigkeitstheorie möglich und ihre Überprüfung notwendig, die Werte k_1 und k_2 einzeln quantitativ zu bestimmen und diese mit der Art der Hemmung, der Wirkungsstärke und der Kinetik der Wirkung eines Pharmakons zu verbinden.
Der langsame Wirkungseintritt der Antagonisten ist also ein Ausdruck der langsamen Geschwindigkeit der Antagonist-Rezeptor-Reaktion.

PATON (140) verglich das Verhältnis k_2/k_1 nach Bestimmung von k_1 und k_2 aus der Kinetik der Wirkung eines Antagonisten mit dem Verhältnis k_2/k_1, das er aus dem Gleichgewichts-Dosis-Verhältnis (170) erhielt. Er fand [illegible] Azetylcholin- als auch am Histamin-Rezeptor (17). Diese Übereinstimmung stellt das stärkste Argument für sein Modell dar. PATON (140) konnte auch zeigen, daß die Wirkungsstärke eines Antagonisten um so größer ist, je langsamer dieser mit den Rezeptor reagiert.
Das "fade" ist ein Effekt, der unmittelbar aus PATONs Modell abgeleitet werden kann und muß. PATON (140) konnte ihn nicht überzeugend demonstrieren. PATON und WAUD (145) sahen sich 1964 veranlaßt zu zeigen, daß es schwierig sei, den "fade"-Effekt zu sehen, weil

(1) die Diffusion gewöhnlich geschwindigkeitsbegrenzend sei,
(2) wenn der "fade"-Effekt am größten ist (hohe [Ph]), dieser so schnell verläuft, daß er fast vermißt wird und
(3) die meisten Agonisten gewöhnlich bei solch niedrigen Konzentrationen wirksam sind, bei denen der "fade"-Effekt nur schwach ausgeprägt ist.

RANG (150) wies nach, daß nicht die Diffusionsgeschwindigkeit (Biophase-Modell (57, 150)), sondern die Assoziationsgeschwindigkeit und die Dissoziationsgeschwindigkeit des Antagonist-Rezeptor-Komplexes für die Kinetik der Wirkung eines Antagonisten verantwortlich sind. Ein eindrucksvolles Versuchsergebnis wird in (144) gezeigt. TIRON und WAUD (185) konnten diese Befunde jedoch nicht bestätigen. Sie fanden weiterhin, daß nach Dibenaminbehandlung des Präparates die Atropin-Kinetik bei konstant gehaltenem pA$_2$ [illegible] wesentlich schneller wurde.
In Experimenten mit partiellen Agonisten, die nach der

Okkupationstheorie eine große Fraktion von Rezeptoren besetzen müssen, um einen vollen Effekt zu entfalten und Atropin wurde bereits unter geringen Atropinkonzentrationen ein von der "intrinsic efficacy" (91) des partiellen Agonisten abhängiges Abflachen und Verringern des Maximums der Dosis-Wirkungs-Kurven gefunden (111, 144, 146, 150, 178). RANG (150) zeigte, daß das Atropin die Rezeptoren so langsam verläßt, daß nicht genügend Rezeptoren während der Exposition des partiellen Agonisten frei werden können.

Unter der Verwendung der Okkupationstheorie kam MACKEY (111) zu dem nicht zu akzeptierenden Schluß, daß Atropin entweder als "pseudoirreversibler" kompetitiver oder als reiner nichtkompetitiver Antagonist wirkt.

Die beeindruckende Einfachheit und die relativ breite Anwendbarkeit der PATONschen Theorie wird allerdings durch eine Vielzahl von experimentellen Befunden eingeschränkt.

Kinetische Messungen der Aufnahme und des Auswaschens von Atropin am Meerschweinchenileum ergaben ein langsameres Geschwindigkeitsverhalten als das der Kinetik des pharmakologischen Effektes und führten PATON und RANG (143) dazu, die ursprüngliche Einfachheit des kinetischen Modells zu verlassen.

Auch die Wirkung einiger adrenerger Pharmaka (141) und die Wirkung von Pharmaka an der motorischen Endplatte (44, 190) läßt sich nicht mit der kinetischen Theorie beschreiben.

Weitere Gegenargumente zur kinetischen Theorie findet man z.B. bei THRON und WAUD (185), BELLAU (21), ARIENS (6) oder BURGEN (25). WAUD (191) faßt die Vorteile der kinetischen Theorie folgendermaßen zusammen:

(1) Sie ist analytisch einfacher als die Okkupationstheorie. Unterschiede der "efficacy" von Pharmaka entsprechen Unterschieden in k_1 und k_2. Eine weitere pharmakonabhängige Größe wird nicht benötigt.

(2) Sie erlaubt eine Erklärung der unterschiedlichen Geschwindigkeit der Wirkung von Agonisten und Antagonisten und sie erklärt die reziproke Abhängigkeit der Wirkungsstärke von der Geschwindigkeit der Wirkung.

(3) Es gibt eine exzellente quantitative Übereinstimmung zwischen den Kinetiken und den Wirkungen für Antagonisten.

(4) Es gibt keine andere Möglichkeit, den pharmakonspezifischen "fade"-Effekt zu erklären.

(5) Die kinetische Theorie hat eine Erklärung für die Verringerung des Anstieges einer Agonist-Dosis-Wirkungs-Kurve in Anwesenheit eines kompetitiven Antagonisten.

(6) Sie ermöglicht, zusätzlich zu K_D auch k_1 und k_2 direkt zu bestimmen.

Eine kinetische Alternative zur Geschwindigkeitstheorie geben PATON und RANG (144) mit der Dissoziationstheorie. So ist es im Gegensatz zu dem Postulat: "Ein Agonist ist ein Agonist, weil er schnell dissoziiert" auch möglich zu sagen: "Ein Agonist dissoziiert schnell, weil er ein Agonist ist".
Dadurch setzt man die Stimulation mit der Geschwindigkeit der Dissoziation in Beziehung. Die Geschwindigkeit der Dissoziation ist jedoch proportional der Energieschwelle, so daß diese Theorie formal nicht von der Okkupationstheorie verschieden ist und identische Aussagen für partielle Agonisten voraussagt.
Da sie aber Aussagen über die unterschiedlichen Geschwindigkeiten der Wirkung von Agonisten und Antagonisten macht und auf einer konsistenten Hypothese [69] beruht, stellen die Autoren (144) die Dissoziationstheorie der Okkupationstheorie vor.

2.1.3. Die Rezeptortheorie unter dem Aspekt wechselnder Konformationszustände, kooperativer Wechselwirkung und chemischer Modifikation der Rezeptorproteine +

Hyperbole Dosis-Wirkungs-Kurven lassen sich mit dem MWG beschreiben (36). So verhalten sich die Dosis-Wirkungs-Kurven von Angiotensin II an Rattenmagenstreifen und an der Kaninchenaorta wie die theoretische Massenwirkungskurve (157):

$$\frac{\text{Effekt}}{\text{Max. Effekt}} = \frac{[A]}{[A] + K_A} \qquad \text{Gl. (16)}$$

Ein zweites Beispiel hierfür sei die Noradrenalin-Dosis-Wirkungs-Kurve an der V. portae der Ratte (62).
Für eine Vielzahl von Pharmaka weichen die Dosis-Wirkungs-Kurven aber stark von der rechtwinklig-hyperbolen Funktion ab (36, 41, 67, 92-94, 102, 103, 180, 181). Ihr Verlauf ist wesentlich steiler. CLARK (36) beschreibt solche sigmoiden Dosis-Wirkungs-Beziehungen als Alles- oder-Nichts-Antwort.

Im Koordinatensystem

$$^{10}\log \frac{\% \text{ Effekt}}{100 - \% \text{ Effekt}} = f\,(^{10}\log [Ph])$$

ergibt sich für diese zu steilen Dosis- Wirkungs-Kurven ein Hill-Koeffizient n_H (= Anstieg der Kurve) von $n_H > 1$.

+ Es soll in diesem Abschnitt nicht versucht werden, die aufgeführten Fakten zu einer einheitlichen und umfassenden Theorie zu verbinden. Die Literaturübersicht dürfte lediglich einige neuere Vorstellungen zum Verständnis der Rezeptor-Problematik vermitteln.

mitunter fast 2. MONOD et al. (119, 120) analysierten, ausgehend von den Him-Him-Wechselwirkungen (166, 167), die erstmals von BOHR (siehe 120) im Jahre 1903 beobachtet wurden, eine Reihe von Enzymkinetiken und erarbeiteten ein mathematisches Modell für allosterisch regulierte Enzyme.
Auf die Pharmakon-Rezeptor-Wechselwirkung angewandt, erklärt dieses Modell (6, 69, 107, 160, 184) die zu steilen Dosis-Wirkungs-Kurven mit einer positiven Kooperativität der spezifischen Rezeptorproteine (38).
Dieser sigmoide Anstieg der Dosis-Wirkungs-Kurven ist nicht von energieliefernden Prozessen abhängig. Er findet sich auch an isolierten Membranen von Electrophorus, die sich zu sogenannten "microsacs" von 0,1 µm bis 1 µm Durchmesser formieren, für den Carbachol-induzierten $^{22}Na^{+}$-flux (92-94).
Eine Reihe von Veränderungen wurden am Azetylcholin-Rezeptor unter dem Einfluß des SH-Gruppen reduzierenden Agens Dithiothreitol, DTT, (= Cleland's Reagens) (38) gefunden (22, 90, 104, 113, 156).
Eine Behandlung des Elektroplax von Electrophorus electricus führte zu einer Verringerung des sigmoiden Charakters der Dosis-Wirkungs-Kurve für Azetylcholin (38, 143).
Am isolierten Kükenmuskelstreifen fanden RANG und RITTER (156) nach DTT eine geringere Empfindlichkeit für Azetylcholin und Carbachol, jedoch eine stärkere Empfindlichkeit für bisquartemäre Verbindungen mit Kettenlängen von C_6 bis C_{10}. Decamethonium, normal ein depolarisierendes Antagonist, wurde zum Agonisten. Die Affinität für Tubocurarin vergrößerte sich um den Faktor 2,4. Alle Effekte des DTT sind durch das Oxidationsmittel 5,5-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure rückgängig zu machen. HARVEY und DRYDEN (73) fanden am kultivierten Kükenmuskel das gleiche Ergebnis.
Auch Dibenamin bewirkt am glatten Muskel ein Abflachen der ursprünglich sigmoiden Dosis-Wirkungs-Kurve für Azetylcholin oder Histamin zu einer Hill-Koeffizienten um 1 (103, 138).

Die Anwesenheit niedriger Konzentrationen von Dekamethonium wandelt die Carbachol-Dosis-Wirkungs-Kurve von einer Sigmoiden in eine Hyperbole, während Gallamin an der neuromuskulären Synapse einen leichten Anstieg des sigmoiden Charakters der Kurve hervorruft (147). Lokalanästhetika rufen einen Anstieg der Affinität des Torpedo-Rezeptors für Agonisten und Antagonisten hervor, bei Konzentrationen, die in vivo an Electrophorus-Electroplax nichtkompetitiv hemmen.
Gleichzeitig ändert sich unter Prilocain der Anstieg der Azetylcholin-Bindungskurve von einem sigmoiden ($n_H = 1,4$) zum hyperbolen ($n_H = 1,0$) (41). Der gleiche Effekt wird bei regulatorischen Enzymen gefunden (142).
Ca^{2+} [illegible] nur einen geringen Effekt auf die kooperative Bindung des Azetylcholins.
Auch der Agonist Azetylcholin selbst bewirkt bei steigender Konzentration eine zunehmende Affinität zum membranständigen Rezeptor in physiologischer Salzlösung bei zunehmendem Verlust der positiven Kooperativität. Dieser Befund soll durch Fig. 18 von COHEN et al. (41) demonstriert werden.

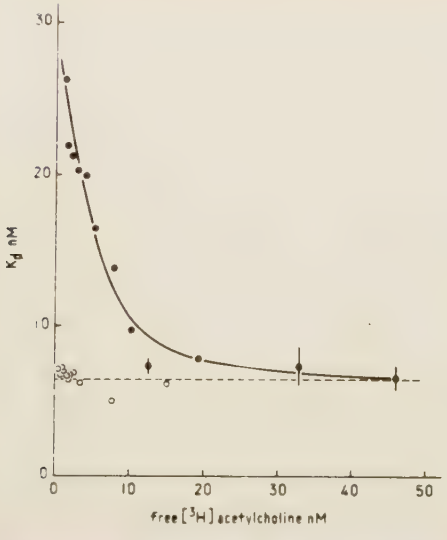
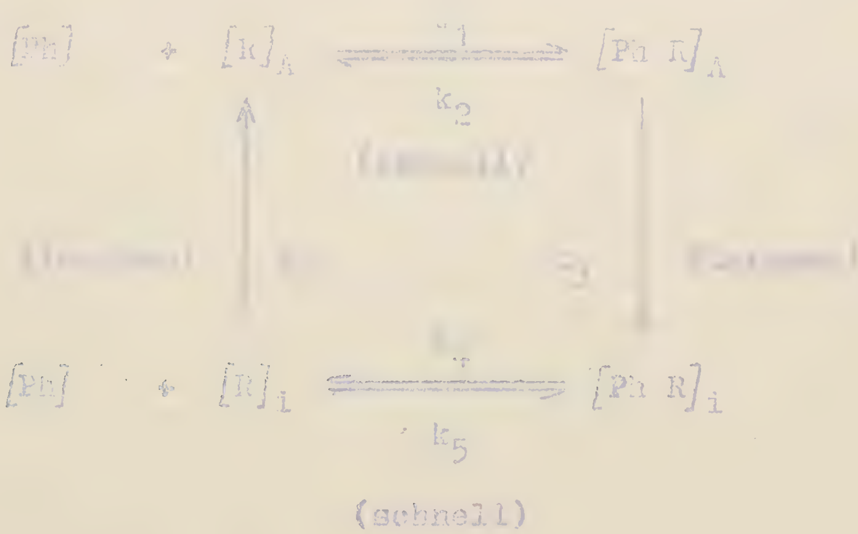


Abb. 2 Variation von K_D als Funktion der freien (^{3}H)-Azetylcholins.

So wird in Anwesenheit von Prilocain die gleiche Affinität zum Azetylcholin-Rezeptor erreicht wie bei Sättigungskonzentrationen von Azetylcholin. SHIMOMA et al. (1[illegible]0) verallgemeinerten diese Befunde zu einem aus drei Konformationszuständen bestehenden Rezeptormodell.
Da in vivo sowohl Lokalanästhetika als auch Ca^{2+} die Geschwindigkeit der Rezeptor-Desensibilisierung (31, 40, 71, 72) vergrößern (112), wäre es möglich, daß die Desensibilisierung die Verstärkung der Affinität zum Rezeptor reflektiert (41).
Bereits 1957 postulierten KATZ und THESLEFF ([illegible]), im wesentlichen auf Grund des Desensibilisierungseffektes, ein zyklisches Modell der Pharmakon-Rezeptor-Wechselwirkung. Dieses Modell wurde in zwei Varianten vorgeschlagen, einer gerichteten und einer reversiblen Form, von denen die gerichtete Form hier vorgestellt werden soll.



[illegible] finden sich in der Literatur ([illegible], 1[illegible]).
[illegible]

Pharmakon-Rezeptor-Komplexes führt zu einer schnellen Konformationsänderung vom aktiven zum refraktären Zustand und parallel dazu zur Auslösung des Effektes. RANG und RITTER (151 - 155) untersuchten auf der Basis des zyklischen Modells die Wirkung verschiedener cholinerger Agonisten und Myorelaxantien und fanden, daß neben dem Agonisten Azetylcholin auch die Antagonisten Gallamin und Tubocurarin eine bevorzugte Affinität zum Rezeptor im Konformationszustand $[R]_A$ besitzen, die depolarisierenden Myorelaxantien Dikanethonium und Succinylcholin dagegen eine bevorzugte Affinität zum Rezeptor im Konformationszustand $[R]_I$ aufweisen. Solche Verbindungen wurden "metaphile Antagonisten" genannt (153, 155). EPSTEIN und GRUNDFEST (52) zeigten die Rezeptordesensibilisierung an einem anderen Synapsentyp, der GABA-(= γ-Amino-butyrat)-sensiblen Synapse an Muskelfasern des Krebses **Cancer** borealis.

Eine einfache, physikalisch-chemische Methode zum Nachweis der im Modell von KATZ und THESLEFF (90) postulierten durch Agonisten hervorgerufenen Konformationsänderungen des Rezeptorproteins stellt die Fluoreszenzspektroskopie dar (179). Sowohl am Azetylcholinrezeptor (32-34, 46, 51, 55, 87, 91, 100, 136, 180) des Elektroplax von Electrophorus electricus als auch am Azetylcholinrezeptor des Torpedo marmorata (39, 116) wurden solche Fluoreszenzuntersuchungen mit der Fluorophore DNS-chol (195) durchgeführt. Unter dem Einfluß von cholinergen Agonisten wurden neben der Intensitätsänderung der Fluoreszenz auch Änderungen der spektralen Eigenschaften des emittierten Lichtes gefunden (39, 95). Diese Fluoreszenzänderungen werden als Hinweis auf eine Konformationsänderung des Rezeptor-Makromoleküls angesehen (39 - 41, 149).

Auch am glatten Muskel wurden Desensibilisierungsphänomene gefunden (20, 29). Es ist hier allerdings ungleich schwieriger, eine Rezeptordesensibilisierung nachzuweisen, da eine unspezifische Effektordesensibilisierung oder auch Organdesensibilisierung (Änderung der Ionengradienten,

des Energievorrates etc.) eine entscheidende Rolle spielt (110). Bei den Desensibilisierungseffekten von Substanz-P-Peptiden an Meerschweinchen-Ileum (36) könnte es sich um einen rezeptorspezifischen Effekt handeln.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß es sich mit großer Wahrscheinlichkeit beim pharmakologischen Rezeptor um ein regulatorisches Protein handelt (115). Die Reaktion eines Agonisten mit diesen Molekül führt zu Änderungen der Konformation des Proteins.

Art, Stärke und Geschwindigkeit der Konformationsänderung bedingen den Effekt. Es existiert eine Kooperativität, d. h. die Konformationsänderung eines Proteins (oder einer Untereinheit) wirkt sich auf die benachbarten Proteine (oder Untereinheiten) aus. Die Reaktionsfähigkeit einer Proteineinheit und / oder die Möglichkeit der wechselseitigen Beeinflussung mehrerer Proteineinheiten untereinander oder mit dem Pharmakon kann durch chemische Modifikation gestört werden.

[illegible] in oder auf der Zellmembran wandernden Rezeptoren, das [illegible]

2.2. Bestimmung scheinbarer Dissoziationskonstanten

In den vorangegangenen Abschnitten wurde ausgeführt, daß sich die Wirkungsstärke eines Pharmakons am Biosystem mit zwei mathematischen Größen beschreiben läßt, mit

(1) der Affinität zum spezifischen Rezeptor und

(2) seiner Fähigkeit, am Biosystem einen Effekt hervorzurufen ("efficacy").

Weder die Affinität noch die "efficacy" lassen sich aus der Dosis-Wirkungs-Kurve eines Agonisten direkt bestimmen, da in den meisten Fällen keine direkte lineare Beziehung zwischen der Zahl der gebildeten Pharmakon-Rezeptor-Komplexe und dem Effekt besteht.
Eine direkte Bestimmung der Affinität von Agonisten ist am isolierten Rezeptorprotein möglich. Sie kann jedoch [illegible] werden, da Unterschiede in der Reaktionsweise eines isolierten Proteins gegenüber dem nativen Rezeptor wahrscheinlich sind. Findet man dennoch eine Übereinstimmung der Dissoziationskonstante am isolierten Rezeptor (103, 114, 137) mit der Dissoziationskonstante am lebenden Organ, kann dies als Argument für die in vivo-Methode gelten.
Zur Bestimmung der Dissoziationskonstante von Pharmaka wurden eine Reihe indirekter Methoden entwickelt, die in den folgenden Abschnitten noch ausführlich besprochen und analysiert werden sollen.

Die Dissoziationskonstante des Pharmakons ist nach der Okkupationstheorie einfach zu definieren. Ausgehend von der Grundgleichung:

$$[Ph] + [R] \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} [PhR] \qquad \text{GL. (17)}$$

[illegible]

$$[illegible]$$

[illegible] der Effektmessung Berücksichtigung [illegible]

[illegible] identisch ist die Dissoziationskonstante des Pharmakon-Rezeptor-Komplexes in der PATONschen Geschwindigkeitstheorie definiert. Zu ihrer Bestimmung werden hier jedoch die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation (k_1) und der Dissoziation (k_2) einzeln bestimmt.
Die Dissoziationskonstante ist hier aber auch gleich der Agonistkonzentration, die eine Gleichgewichtsantwort hervorruft, die 50 % des Initialeffektes beträgt (140). Wesentlich komplizierter wird das Verständnis der Dissoziationskonstante bei Betrachtung der sterischen Konformationsänderungen, denen das Rezeptorprotein bei Reaktion mit dem Pharmakon unterliegt. In dem gerichteten Modell von KATZ und THESLEFF (99) kann die Dissoziationskonstante des Pharmakon-Rezeptor-Komplexes nicht mehr nur als das Verhältnis von k_2/k_1 definiert werden (siehe 1.1.3.). Wenn das Rezeptorprotein in (mindestens) zwei Konformationszuständen vorliegen kann, so müßten auch (mindestens) zwei Dissoziationskonstanten existieren. Nach dem zyklischen Modell würde sich die Dissoziationskonstante für Agonisten eher aus den Geschwindigkeitskonstanten k_1, k_3, k_4 und weniger aus k_2 und k_5 zusammensetzen.

Auf Grund der [illegible] dieser Methoden der Bestimmung von Dissoziationskonstanten wird von den meisten Autoren von Bestimmung einer "scheinbaren" Dissoziationskonstante gesprochen. Diese Bezeichnung ist in jedem Falle am berechtigen, da sich die Dissoziationskonstante, wie sie in der Chemie verstanden wird, nur aus dem Verhältnis k_2/k_1 zusammensetzt. Trotz der oben geschilderten Schwierigkeit der exakten Definition der scheinbaren Dissoziationskonstante wurde eine Reihe von Bestimmungsmethoden erarbeitet.
Die Übereinstimmung der mit verschiedenen Methoden gefundenen Dissoziationskonstante läßt annehmen, daß der ermittelte Parameter tatsächlich einer Dissoziationskonstante entspricht. (Siehe Tab. 1)
Einige Ergebnisse von Bestimmungen scheinbarer Dissoziationskonstanten an isolierten cholinergen Rezeptorprotein sind in Tab. 2 aufgeführt.

2.2.1. Die Methode der Kombination sequentiell wirkender Dosen

Nachdem STEPHENSON (17.) eine nichtlineare Beziehung zwischen Rezeptorbesetzung und Effekt postuliert hatte, wonach starke Agonisten auch bei einer kleinen Rezeptorbesetzung schon einen Maximaleffekt auslösen können, bestimmte er zum Beweis für eine Reihe von Alkyl-Trimethylammoniumverbindungen die Affinität zum Rezeptor und die "efficacy" (16, 135, 138, 176, 193).
Die Methode beruht auf folgenden Überlegungen:

$[A]_1$, $[A]_2$ und $[A]_3$ seien Konzentrationen eines starken Agonisten mit einer "efficacy" e_A. $[P]$ sei die Konzentration eines partiellen Agonisten mit der "efficacy" e_P.

$[A]_1$ soll den gleichen Effekt wie $[P]$ hervorrufen und $[A]_2$ produziert den gleichen Effekt wie $[P] + [A]_3$ zusammen.

Für Gl. (4) kann man schreiben:

$$\frac{E_{A1}}{E_M} = f(S_1) \quad \text{und entsprechend} \quad \frac{E_A}{E_M} = f(S_2)$$

p_P ist der Anteil der von $[P]$ besetzten Rezeptoren, unabhängig darvon, ob $[A]_3$ anwesend ist oder nicht. (Der starke Agonist besetzt zur Bildung des Effekts eine vernachlässigbare Fraktion an Rezeptoren.)

Aus Gl. (5) folgt:

$$S_1 = e_P \cdot p_P \quad \text{und} \quad S_1 = e_A \cdot K \cdot [A]_1$$

$$e_P \cdot p_P = e_A \cdot K \cdot [A]_1 \qquad \text{Gl. (19)}$$

Wenn man annimmt, daß S sich additiv verhält, dann ist

$$S_2 = c_P \cdot p_P + c_A \cdot K \cdot [A]_3 \cdot (1 - p_P)$$

(da $[P]$ eine signifikante Fraktion an Rezeptoren besetzt)

und

$$S_2 = c_A \cdot K \cdot [A]_2$$

$$[A]_2 = c_P \cdot p_P + c_A \cdot K \cdot [A]_3 \cdot (1 - p_P) \qquad \text{Gl. (20)}$$

Durch Substitution von Gl. (1[illegible]) und Gl. (20) folgt:

$$c_A \cdot K \cdot [A]_2 = c_A \cdot K \cdot [A]_1 + c_A \cdot K \cdot [A]_3 \cdot (1 - p_P)$$

und

$$1 - p_P = \frac{[A]_2 - [A]_1}{[A]_3} \qquad \text{Gl. (21)}$$

Die reziproken Werte (= Dissoziationskonstanten) einiger von STEPHENSON (178) nach diesem Verfahren bestimmten Affinitäten sind in Tab. 1 aufgeführt.

2.2.2. Die Methode der Verwendung sogenannter "irreversibler kompetitiver" Antagonisten

Alkylierende Verbindungen vom β-Halogalkylamintyp können irreversible Reaktionen mit verschiedenen Rezeptoren durchführen (1, 74, 75, 125, 126, 192). Solche Rezeptorblockaden sind möglich am Acetylcholin-Rezeptor (13[illegible], 16[illegible]), am Histaminrezeptor (130), am adrenergen β -Rezeptor (123, 124, 126, 12[illegible], 131, 133, 134) und auch am Serotoninrezeptor.
Aus sogenannten "self-protection"- und "cross-protection"-Versuchen (1[illegible]9) mit Hilfe dieser Verbindungen, meist Dibenamin oder Phenoxybenzamin (135, 196), wurden

(1) auf einen spezifischen Angriff dieser Verbindungen an der Agonist-Bindungsstelle des Rezeptors geschlossen (127, 132) und

(2) die Rezeptoren nach ihrem spezifischen Agonisten klassifiziert (56 - 5[illegible], 60, siehe auch 101).

Die am isolierten Gewebe gebräuchlichste Methode der Bestimmung scheinbarer Dissoziationskonstanten beruht auf der Anwendung solcher "irreversibler kompetitiver" Antagonisten.
Das von FURCHGOTT (59, 61) beschriebene Verfahren basiert auf der [illegible] STEPHENSONs [illegible].
(Siehe Gl. 8 - 11)

$$\frac{E_A}{E_M} = f\left(e \cdot \frac{[A]}{K_A + [A]} \right)$$ ist der gleiche Begriff, den

STEPHENSON [illegible] gebrauchte. Anstatt von [illegible] wurde [illegible]lich K, die Affinitätskonstante, der reziproke Wert von K_A, verwendet.
[illegible] die Konzentration [illegible] auf eine [illegible]
durch [illegible] des Präparates mit einem [illegible]

inaktivierenden Agens, dann wird die effektive "efficacy" gleich $\hat{\varepsilon} \cdot q \cdot [R]_T$ oder $q \cdot e$ und Gl. (11) wird zu

$$\frac{v'}{E'_M} = f(S') = f\left(\hat{\varepsilon} \cdot q \cdot [R]_T \cdot \frac{[A']}{K_A + [A']}\right)$$

$$= f\left(q \cdot e \cdot \frac{[A']}{K_A + [A']}\right) \qquad \text{Gl. (22)}$$

Gleiche Effekte vor und nach irreversibler Blockade werden erhalten, wenn gleiche Stimuli auf das Präparat ausgeübt werden.
Wenn S gleich S', erhält man aus Gl. (11) und Gl. (22)

$$1/[A] = 1/q \cdot [A'] + (1-q) / q \cdot K_A \qquad \text{Gl. (23)}$$

Das Auftragen von $1/[A]$ gegen $1/[A']$ ergibt eine Gerade mit dem Anstieg $1/q$ und einem Schnittpunkt auf der $1/[A]$-Achse von $1 - q/q \cdot K_A$.
Für die praktische Bestimmung von K_A aus dieser Geraden kann man vereinfacht schreiben

$$K_A = \frac{\text{Anstieg} - 1}{\text{Schnittpunkt}} \qquad \text{Gl. (24)}$$

2.2.3. Die Methode der Verwendung von β-Haloalkylaminen zur Umwandlung von partiellen Agonisten in kompetitive Antagonisten

Diese nur für partielle Agonisten an β-Haloalkylamin-blockierbaren Rezeptoren anzuwendende Methode wurde von FURCHGOTT und BURSZTYN (61) beschrieben und zur Überprüfung der sogenannten klassischen Blockademethode (59) verwendet. (15, 130, 192, 199)

Dieses Verfahren beruht darauf, das Präparat so stark mit Dibenamin zu behandeln, daß zwar ein starker Agonist noch einen Effekt produziert, der partielle Agonist aber keinen nachweisbaren Effekt mehr bewirken kann, er sich also wie ein kompetitiver Antagonist verhält und auch als solcher betrachtet wird.

Nach der Blockade wird eine Dosis-Wirkungs-Kurve für einen starken Agonisten und anschließend bei konstanten Konzentrationen des zu untersuchenden partiellen Agonisten eine zweite Dosis-Wirkungs-Kurve bestimmt.

Nach der Beziehung

$$K_B = \frac{[B]}{\text{Dosisverhältnis} - 1} \qquad \text{Gl. (25)}$$

kann K_B bestimmt werden. Für K_B wird häufig der pA_2-Wert ($= -^{10}\log K_B$) angegeben.

Theoretisch müßte K_B nach dieser Methode gleich K_A nach der klassischen Methode für eine bestimmte Verbindung sein.

Eine gute bis befriedigende Übereinstimmung konnte gefunden werden (siehe Tabelle 1).

2.2.4. Die Methode des Vergleiches der Dosis-Wirkungs-Kurve eines partiellen Agonisten mit der eines starken Agonisten zur Dissoziationskonstanten-bestimmung für partielle Agonisten

WAUD (133, 139, 192, 193) gab eine Methode der Bestimmung von K_A an, die sich allerdings auch nur für partielle Agonisten eignet.
Die mathematische Grundlage ist einfach:
Die Funktion [illegible] für den starken Agonisten

$$p_A = \frac{[A]}{[A] + K_A} \approx \frac{[A]}{K_A} \qquad \text{Gl. (26)}$$

und für den partiellen Agonisten

$$p_P = \frac{[P]}{[P] + K_P} \qquad \text{Gl. (27)}$$

Produzieren beide Agonisten gleiche Effekte, so gilt:

$$\frac{E_A}{E_M} = f(e_A \cdot p_A) = f(e_P \cdot p_P) = \frac{E_P}{E_M} \qquad \text{Gl. (28)}$$

und

$$e_A \cdot \frac{[A]}{K_A} = e_P \cdot \frac{[P]}{[P] + K_P} \qquad \text{Gl. (29)}$$

Durch Umstellung von Gl. (29) erhält man

$$\frac{1}{[A]} = \frac{\nu_A}{K_A \cdot c_P} + \frac{\nu_A}{K_A \cdot c_P} \cdot K_P \cdot \frac{1}{[P]} \qquad \text{Gl. (36)}$$

Trägt man die acquicfiltiven Dosen analog Methode 2.2.2. in ein Koordinatensystem $1/[A]$ gegen $1/[P]$, so ergibt sich K_p aus der vereinfachten Beziehung:

$$K_P = \frac{\text{Anstieg}}{\text{Schnittpunkt}} \qquad \text{Gl. (37)}$$

2.2.5. Die Bestimmung der Dissoziationskonstante von Agonisten durch Variation der extrazellulären Ca^{2+}-Konzentration

Ein prinzipiell nicht unterschiedliches Verfahren verwendete GIAO T. RICO (6.) für einige cholinerge Agonisten und Histamin am Meerschweinchenileum. Er führte mit C einen zur "intrinsic efficacy" (ϵ) von FURCHGOTT zusätzlichen "efficiency factor" in die FURCHGOTTsche Beziehung (Gl.(11)) ein, der von der Menge des in der Zelle durch Aktivierung des Rezeptors mobilisierten $[Ca^{2+}]$ abhängt, die wiederum durch die extrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration beeinflußt wird. (Siehe auch 73)

Die FURCHGOTTsche Beziehung (Gl. (11)) ändert sich zu folgenden Ausdruck:

$$\frac{E_A}{E_M} = f (S) = f \left(\frac{\varepsilon \cdot C \cdot [R]_T \cdot [A]}{[A] + K_A} \right) \qquad \text{Gl. (32)}$$

Vergleicht man aequieffektive Agonistkonzentrationen $[A]$ und $[A']$ bei zwei verschiedenen Ca^{2+}-Konzentrationen $[Ca^{2+}]_1$ und $[Ca^{2+}]_2$ und gibt das Verhältnis von $[Ca^{2+}]_1 / [Ca^{2+}]_2$ als C an, wobei man $[Ca^{2+}]_1$ als 1 gesetzt hat, erhält man analog FURCHGOTT (59):

$$\frac{1}{[A]} = \frac{1 - C}{C \cdot K_A} + \frac{1}{C} \cdot \frac{1}{[A']} \qquad \text{Gl. (33)}$$

Ein Auftragen der aequieffektiven Konzentrationen im Koordinatensystem $1/[A]$ gegen $1/[A']$ ergibt eine Gerade mit dem Anstieg $1/C$ und einem Schnittpunkt auf der $1/[A]$-Achse von $1 - C/C$ K_A.

Aus dieser Geraden kann man die Dissoziationskonstante nach der vereinfachten Beziehung

$$K_A = \frac{\text{Anstieg} - 1}{\text{Schnittpunkt}}$$

bestimmen.
Einige von GIAO E. RICO (63) nach dieser Methode ermittelte Werte sind in Tab. 1 aufgeführt.

Ein Vergleich der vorgestellten indirekten Bestimmungsmethoden der scheinbaren Dissoziationskonstanten von Agonist-Rezeptor-Komplexen macht deutlich, daß die Grundkonzeption der meisten Methoden übereinstimmen.
Es wird davon ausgegangen, daß der starke Agonist eine im Gegensatz zum partiellen Agonisten vernachlässigbar kleine Fraktion der $[R]_T$ besetzt, um einen Effekt hervorzurufen. Weiterhin wird vorausgesetzt, daß gleiche Stimuli stets den gleichen Effekt hervorrufen. Der Stimulus setzt sich aus mehreren Parametern zusammen.
Die wesentlichsten Parameter, die bei der Dissoziationskonstanten-Bestimmung eine Rolle spielen, sind

(1) $[R]_T$, die totale Rezeptorkonzentration, die durch ß-Haloalkylaminbehandlung auf eine Fraktion q verringert wird. Als Kompensation wird $[A]$ zu $[A']$, also die Agonistkonzentration wird erhöht.

(2) die "efficacy" oder besser die "intrinsic efficacy", in der sich ein starker Agonist von einem schwachen Agonisten unterscheidet. Ein dem starken Agonisten gleicher Stimulus kann bei $[R]_T$ = const. vom partiellen Agonisten wiederum durch eine höhere Konzentration erreicht werden, allerdings nur bis zu einer 100 %igen Rezeptorbesetzung.

(3) der von GIAO T. RICO eingeführte Wert C, der von der externen $[Ca^{2+}]$ abhängt, und einer Variation der "intrinsic efficacy" bei $[R]_T$ = const. entspricht.

Eine weitere wesentliche Voraussetzung dieser Methoden der Konstanthaltung des Stimulus bei willkürlicher Veränderung eines den Stimulus bestimmenden Parameters mit kom-

pensatorischer Konzentrationserhöhung des Agonisten ist die Annahme, daß die scheinbare Dissoziationskonstante des Agonist-Rezeptor-Komplexes durch Dibenamin-Behandlung oder Variation der Ca^{2+}-Konzentration konstant bleibt.

Bei der Methode von WAUD (192) wird von vorn herein die scheinbare Dissoziationskonstante des Agonisten mit geringerer "efficacy" (partieller Agonist) bestimmt.

Vergleicht man die Gleichungsansätze für gleiche Stimuli von FURCHGOTT (59) und WAUD (192)

$$e_A = \frac{[A]}{[A] + K_A}$$

= FURCHGOTTs Gleichung für gleiche Stimuli vor und nach Blockade mit Dibenamin (Gl. (11) und Gl. (22))

$$e_P = \frac{[P]}{[P] + K_P}$$

= WAUDs Gleichung für gleiche Stimuli stärker und partieller Agonisten (Gl. (28)),

und setzt man die rechten Teile der beiden Gleichungen gleich, so ergibt sich

$$q \cdot e_A \cdot \frac{[A']}{[A'] + K_A} = e_P \cdot \frac{[P]}{[P] + K_P} \qquad \text{Gl. (35)}$$

$[A']$ sei gleich $[P]$

$$\frac{e_A}{e_P} = \frac{[P]\,([P] + K_A)}{[P]\,([P] + K_P)} \cdot \frac{1}{q}$$

$$q = \frac{[P] \cdot K_A}{[P] + K_P} \cdot \frac{c_P}{c_A} \qquad \text{Gl. (37)}$$

Gl. (37) könnte folgendermaßen interpretiert werden:
Je stärker die Rezeptorblockade, desto geringer wird die Fraktion q der noch aktivierbaren Rezeptoren, q wird also sehr klein.
Betrachtet man andererseits einen sehr schwachen partiellen Agonisten, so braucht man sehr hohe Konzentrationen, um einen entsprechenden Effekt auszulösen. Je höher die für die Effektauslösung notwendigen Pharmakonkonzentrationen oder je geringer die Unterschiede von K_A und K_P sind, desto geringer werden die Einflüsse von K_A und K_P, der Wert

$\frac{[P] \cdot K_A}{[P] + K_P}$ strebt einen Wert von 1 zu, so daß sich

die Gleichung auf $q \approx \frac{c_P}{c_A}$ reduziert.

Die Verringerung von q bei der Dibenaminmethode würde also einer unterschiedlichen "efficacy" e_A und e_P bei der WAUDschen Methode entsprechen.

Zusammenfassend kann der Schluß gezogen werden, daß es methodisch belanglos zu sein scheint, ob $[R]_T$ auf eine Fraktion q verringert wird, oder ob die "efficacy" durch eine Variation der Ca^{2+}-Konzentration erniedrigt wird oder ob von vornherein ein partieller Agonist mit geringerer "efficacy" in Vergleich zu einem starken Agonisten verwendet wird, um die scheinbare Dissoziationskonstante des partiellen Agonisten durch Dosis-Vergleich zu bestimmen. Damit war der gedankliche Ansatz für eigene Untersuchungen und die Entwicklung einer neuen Methode zur Bestimmung der scheinbaren Dissoziationskonstante gegeben.

3. Experimenteller Teil

3.1. Eine neue Methode der Bestimmung der scheinbaren Dissoziationskonstante von Agonisten ohne Verwendung von Antagonisten

3.1.1. Theoretischer Grundgedanke

Ausgehend von den im vorherigen Abschnitt beschriebenen Methoden der Bestimmung scheinbarer Dissoziationskonstanten, von denen für starke Agonisten praktisch nur die unter 2.2.2. und 2.2.5. anzuwenden sind, wurden folgende Überlegungen angestellt:

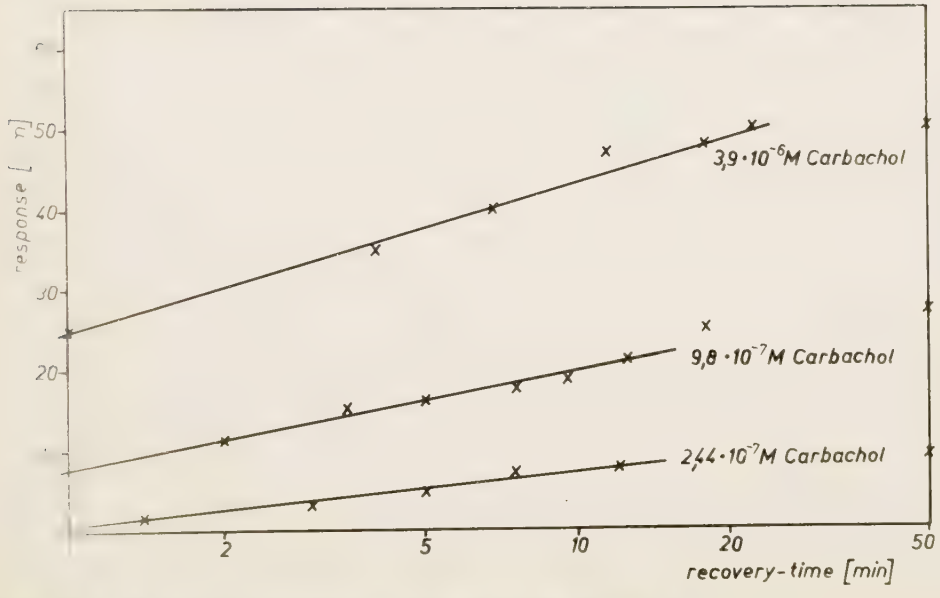
Eine Reihe von Agonisten bewirkt bei längerer Einwirkung relativ hoher Konzentrationen am glatten Muskel eine sogenannte unspezifische Desensibilisierung (110). Unter dieser Behandlung wird das Präparat nicht nur für den den desensibilisierenden Agonisten, sondern auch für Pharmaka, die an anderen Rezeptoren wirken, unempfindlicher. Ursache einer solchen unspezifischen Desensibilisierung können Verschiebungen der Ionengradienten, Veränderungen des Energiezustandes der Zelle etc. sein (26, 28, 29, 54, 84, 110, 174, 182). Diese sollen hier nicht weiter untersucht werden.
Es bleibt der Fakt der unspezifischen Desensibilisierung, der Stimulus, der auf das kontraktile Element wirkt, wird für eine entsprechende Pharmakonkonzentration verringert. Nach den Erkenntnissen im theoretischen Teil kann postuliert werden, daß sich Carbachol am desensibilisierten Organ wie ein partieller Agonist verhält und dessen scheinbare Dissoziationskonstante nach der WAUDschen Methode (192) im Vergleich mit dem starken Agonisten Carbachol vor Desensibilisierung bestimmt werden kann.

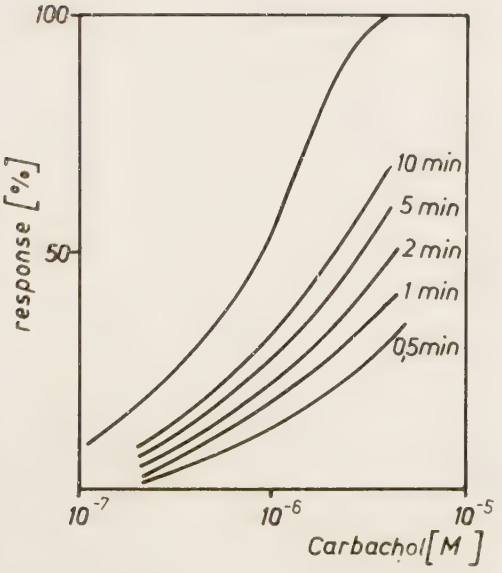
Die experimentellen Ergebnisse [illegible] (121, 122).

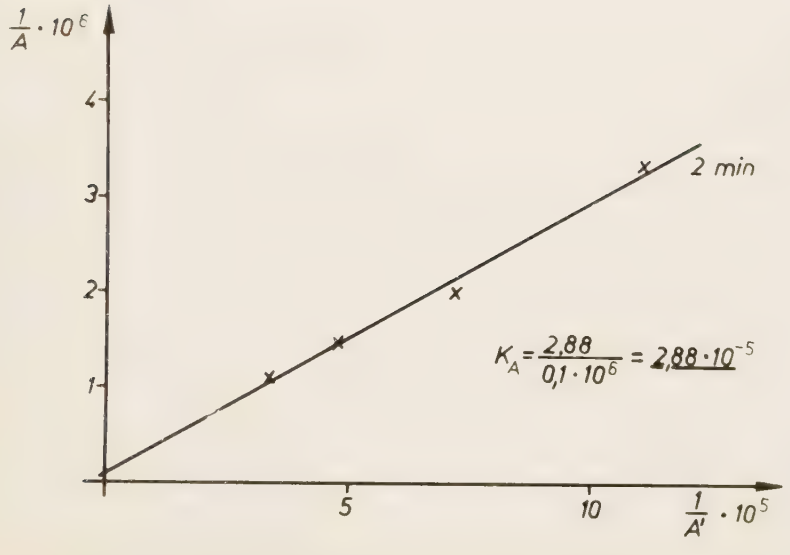
Die wichtigste methodische Voraussetzung ist die Gewinnung einer kompletten Dosis-Wirkungs-Kurve bei einem definierten Desensibilisierungsgrad.

3.1.2. Material und Methodik

Mittels einer MAGNUS-Apparatur wurden Einzel-Dosis-Wirkungs-Kurven mit Carbachol in einer 1:4-Verdünnungsreihe in Konzentrationen von $6{,}1 \cdot 10^{-8}$ M bis $3{,}8 \cdot 10^{-6}$ M am Ratten-Ileum produziert. Das Volumen des Bades betrug 6,5 ml, die Zugabe jeweils 0,2 ml. Das Organ wurde in luftdurchperlter phosphatgepufferter Tyrodelösung, pH 7,0, bei 35 °C aufgehängt.
Die Tyrodelösung hatte folgende Zusammensetzung (in 10^{-3} M/l): NaCl 146; KCl 2,56; $MgCl_2$ 0,95; $CaCl_2$ 1,8; Glukose 5,55; NaH_2PO_4 1,4.
Die Registrierung der Kontraktionen erfolgte isometrisch auf einem Kompensationsbandschreiber unter Verwendung eines HSE-Biegestabes K 30 und einer HSE-Gleichspannungsmeßbrücke.
Nach 30 min Aequilibrierung des Präparates im Organbad wurden drei Dosis-Wirkungs-Kurven produziert. Damit wurde eine konstante Reaktion des Präparates erzielt. Das Auswaschen der Substanz erfolgte jeweils nach Erreichen des entsprechenden Effektes durch kräftiges Spülen.
Nach der dritten Dosis-Wirkungs-Kurve wurde das Präparat mit $1{,}56 \cdot 10^{-5}$ M Carbachol für 10 min inkubiert. Diese Behandlung führte zu einer starken Desensibilisierung. Nach kräftigem Auswaschen des Carbachols wurde das Abklingen der Desensibilisierung mit drei Testdosen Carbachol ($2{,}44 \cdot 10^{-7}$ M; $9{,}8 \cdot 10^{-7}$ M und $3{,}9 \cdot 10^{-6}$ M) geprüft. Diese geringen nur kurzzeitig einwirkenden Konzentrationen haben keinen nachweisbaren Einfluß auf die Desensibili-


response [n]
50
40
30
20
3,9 · 10⁻⁶M Carbachol
9,8 · 10⁻⁷M Carbachol
2,44 · 10⁻⁷M Carbachol
2
5
10
20
50
recovery-time [min]


100
50
response [%]
10 min
5 min
2 min
1 min
0,5min
10^-7
10^-6
10^-5
Carbachol [M]


$\frac{1}{A} \cdot 10^6$
4
3
2
1
2 min
$K_A = \frac{2,88}{0,1 \cdot 10^6} = 2,88 \cdot 10^{-5}$
5
10
$\frac{1}{A'} \cdot 10^5$

[illegible]

Die ermittelten K_A-Werte sind in tabellarischer Form [illegible]

n	ED_{50} [M] $\cdot 10^{-7}$	pD_2	K_A [M] $\cdot 10^{-5}$	pK_A	[illegible]
1	0,0	6,10	1,3	4,89	1
2	12,0	5,92	4,1	4,39	1
3	6,0	6,22	1,7	4,77	1
4	9,0	6,05	2,9	4,54	2
			3,0	4,52	5
5	9,2	6,04	2,9	4,53	1
6	1,2	6,92	1,1	4,96	1
7	4,5	6,35	3,2	4,50	5
		$\bar{x} = 6,23$		$\bar{x} = 4,65$	
		$pD_2 = 6,23 \pm 0,059^{1)}$		$pK_A = 4,65 \pm 0,025^{1)}$	
		$ED_{50} = 5,9 \cdot 10^{-7}$ M		$K_A = 2,2 \cdot 10^{-5}$ M	

$^{1)}p < 0,01$ (Student's t-Test)

Tab. 3 : Zusammenstellung der Einzelversuche zur Bestim[illegible] der scheinbaren Dissoziationskonstante für Carbachol an Rattenileum

Ein Vergleich der hier ermittelten Dissoziationskonstante für Carbachol von $K_A = 2{,}2 \cdot 10^{-5}$ M mit Literaturwerten, die nach der klassischen Dibenamin-methode bestimmt wurden, zeigt, daß die nach dem neu entwickelten Verfahren erhaltene scheinbare Dissoziationskonstante mit diesen vergleichbar ist. (siehe Tab. 1) Bezogen auf das theoretisch in Abschnitt 2.2.6. abgeleitete und formulierte Postulat bedeutet diese Vergleichbarkeit der Ergebnisse eine Bestätigung der Richtigkeit des Postulats und einen Beweis dafür, daß es praktisch völlig belanglos ist, ob die Bestimmung einer scheinbaren Dissoziationskonstante nach dem Verfahren des Vergleiches aequieffektiver Dosen mit Hilfe der Reduktion von [R] oder irgendeines Parameters, der unter dem Begriff "efficacy" einzuordnen ist, durchgeführt wird.
Die mathematisch-theoretische Grundlage ergibt sich aus den Betrachtungen in Abschnitt 2.2.6.
Die neue Methode benötigt zur Bestimmung der scheinbaren Dissoziationskonstante nur ein Pharmakon, den Agonisten. Es wird weder ein kompetitiver noch ein "irreversibler kompetitiver" Antagonist benötigt.
Dies könnte von Vorteil bei der Bestimmung von scheinbaren Dissoziationskonstanten an solchen Rezeptoren sein, für die keine "irreversiblen kompetitiven" Antagonisten bekannt sind, wie z.B. die Rezeptoren einiger vasokonstriktorischer Peptide, einige Aminosäurerezeptoren oder der adrenerge

Für diese Rezeptortypen bot sich bisher nur das Verfahren der externen $[Ca^{2+}]$ -Variation an.
Für die Bestimmung der Rezeptorreserve bei Peptidrezeptoren (22a) kann das neue Verfahren mit seiner theoretischen Betrachtung in Abschnitt 2.2.6. als theoretische Bestätigung der Richtigkeit der dort durchgeführten Berechnungen gelten, obwohl in diesem Falle die Desensibilisierung nicht unspezifisch zu sein scheint.

3.2. Zum allosterischen Angriff der β-Haloalkylamine

Im folgenden Abschnitt soll das klassische Verfahren der Bestimmung der scheinbaren Dissoziationskonstante unter den Aspekt der in Abschnitt 2.2.6. zusammengefaßten Erkenntnisse des theoretischen Teils der Arbeit und der im Abschnitt 3.1. dargestellten neuen Methode analysiert werden, da in letzter Zeit in der Literatur (siehe Abschnitt 3.2.1.) zahlreiche Hinweise für einen den FURCHGOTTschen Prämissen widersprechenden Angriff der β-Haloalkylamine zu finden sind.

3.2.1. [illegible]

Beim Vergleich der Methoden zur Bestimmung der scheinbaren Dissoziationskonstante wurde bisher immer davon ausgegangen, daß beim klassischen Verfahren FURCHGOTTs (59) mit Dibenamin tatsächlich $[R]_T$ auf eine Fraktion q verringert wird. Die grundlegenden Arbeitshypothesen FURCHGOTTs (59) waren folgende:

(1) Die β-Haloalkylamine reagieren chemisch mit der gleichen aktiven Stelle des Rezeptors wie der Agonist und inaktivieren dadurch den Rezeptor praktisch irreversibel.

(2) Ein Agonist formiert einen dissoziierbaren Komplex mit dieser aktiven Stelle und verhindert dadurch praktisch eine Reaktion mit β-Haloalkylaminen.

[illegible]

konstante des Agonist-Rezeptor-Komplexes) wird die Zahl der durch die β-Haloalkylamin-Kommandine inaktivierten Rezeptoren stark reduziert sein ("self protection").

Auf diesen drei Arbeitshypothesen beruhen die "self protection"- und "cross protection"-Versuche FURCHGOTTs (59) sowie seine Methode der Bestimmung von K_A (vorwiegend Hypothese (1)).
Neuere Befunde lassen allerdings gewisse Zweifel an dem Konzept der direkten Rezeptorblockade entstehen.
So wurden für alkylierende Verbindungen, zu denen die β-Haloalkylamine gehören, unspezifische allosterische Wechselwirkungen mit multiplen Bindungsstellen am Rattenileum gefunden (77, 102). Am Meerschweinchen-Ileum ändern die β-Haloalkylamine (speziell Dibenamin) die Dosis-Wirkungs-Kurven einiger quartemärer Pyridine in einer Weise, die sich nicht mit einer einfachen Rezeptorblockade beschreiben läßt und einen allosterischen Angriffspunkt der β-Haloalkylamine annehmen ließ (102, 103).
Betrachtet man weiterhin die Dosis-Wirkungs-Kurven für cholinerge Agonisten, Histamin oder Serotonin am glatten Muskel, so kann man die extreme Steilheit der Dosis-Wirkungs-Kurven mit Hill-Koeffizienten deutlich größer als $n_H = 1$ als positive Kooperativität der einzelnen Agonist-Bindungsstellen analog den Reaktionsweisen allosterischer Proteine deuten (50). Ausführliche Betrachtungen wurden bereits im Abschnitt 2.1.3. ausgeführt.
Bei einer Dibenamin-Behandlung eines glatten Muskels findet man einen Übergang der Dosis-Wirkungs-Kurven vom sigmoiden zum hyperbolen Verlauf.
Am cholinergen und histaminergen Rezeptor des Meerschweinchen-Ileums fand KUHMMD-CLAUSEN (103), daß der eigentliche Agonist auch bei sehr hohen Konzentrationen (über $5 \cdot 10^{-5}$ M) nur eine sehr geringe Schutzwirkung gegenüber Dibenamin zeigte.
Lachesin und TMB-4 bewirkten einen wesentlich stärkeren Schutzeffekt. Auch die Hill-Koeffizienten der Dosis-Wirkungs-Kurven verringerten sich unter Lachesin- und TMB-4-Schutz weniger als unter dem Blockadeschutz des Agonisten.

2.1.3. [illegible]

Der experimentelle Versuchsaufbau wurde [illegible] 2.1.2. übernommen.
Die Carbachol-Konzentrationen betrugen 2,5 × 10^{-7} [illegible] 10^{-3} M.
Als Vertreter der β-Haloalkylamine wurde Phenoxybenzamin (Dibenzyline, Rohm & Haas) in einer Konzentration von 10^{-5} M eingesetzt. Im Gegensatz zu 2.1.2. wurde hier das jeweils von einer Ratte gewonnene 3 cm lange Ileum-Stück längs halbiert und die Hälften jeweils für Experiment A und B verwendet.
Zum Versuch wurden nur solche Präparate verwendet, die zu Versuchsbeginn entsprechend steile Dosis-Wirkungs-Kurven zeigten.
Es wurden zwei Typen von Experimenten (A und B) durchgeführt.

Experiment A:

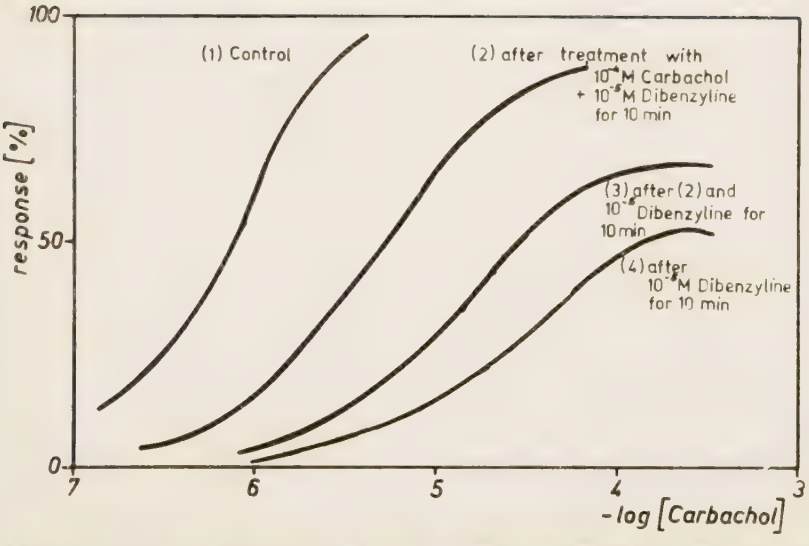
An einem halben Ileum-Streifen wurden isometrische Einzel-Dosis-Wirkungs-Kurven für Carbachol produziert. Die dritte Dosis-Wirkungs-Kurve konnte als konstant betrachtet werden. Es folgte eine Behandlung des Präparates mit 10^{-5} M Phenoxybenzamin für 10 min.
Nach längerem starken Ausspülen des nicht gebundenen Phenoxybenzamins (etwa 15 min) konnten wieder konstante Carbachol-Dosis-Wirkungs-Kurven produziert werden.

Experiment B:

Nachdem sich an der frischen zweiten Hälfte des Präparates konstante Dosis-Wirkungs-Kurven produzieren ließen (3. Dosis-Wirkungs-Kurve), wurde das Präparat unter einer "Schutzdosis" von 10^{-4} M Carbachol für 10 min mit 10^{-5} M Phenoxybenzamin behandelt. Nach Ausspülen wurde die Carbachol-

Dosis-Wirkungs-Kurve geschrieben.
Danach wurde das Präparat wie in Experiment A mit 10^{-5} M Phenoxybenzamin für 10 min behandelt und nach Auswaschen die Dosis-Wirkungs-Kurve für Carbachol registriert.

Nach der Furchgottschen Beziehung (59) Gl. (23) wurde die Fraktion der noch aktivierbaren Rezeptoren q für jeden Einzelversuch bestimmt und das Verhältnis der q-Werte in beiden Experimenten berechnet.


100
50
0
response [%]
(1) Control
(2) after treatment with
10⁻⁴M Carbachol
+ 10⁻⁵M Dibenzyline
for 10 min
(3) after (2) and
10⁻⁵ Dibenzyline for
10 min
(4) after
10⁻⁴M Dibenzyline
for 10 min
7
6
5
4
3
- log [Carbachol]

die nach Gl. (23) in den zwei verschiedenen Versuchsserien (a und b) ermittelten q-Werte sind in Tab. (4) als negative Logarithmen aufgeführt.
In beiden Serien unterscheiden sich die q-Werte nach Experiment A und Experiment B um einen Faktor von > 2 mit $p \leq 0{,}05$ (STUDENT's Paarvergleich), d.h. nach der zweifachen Phenoxybenzaminbehandlung (Experiment B) bleibt eine größere Fraktion q von Rezeptoren aktivierbar als nach der einmaligen Zugabe (Experiment A).

Die Interpretation dieses Ergebnisses schließt eine Gültigkeit der MACKOWschen Arbeitshypothesen (Abschnitt 3.2.1.) aus. Würde das Phenoxybenzamin an der Agonist-Bindungsstelle reagieren, müßten nach der zweimaligen Behandlung des Präparates (Experiment B) gleichviele oder mehr Rezeptoren blockiert werden, als nach Experiment A. Die Fraktion der noch aktivierbaren Rezeptoren wäre geringer (oder höchstens gleich) als nach Experiment A.
Unter der Annahme eines allosterischen Angriffs der Haloalkylamine könnte man dagegen folgendes diskutieren:

Die Phenoxybenzaminbehandlung in Versuch B führt trotz des Carbachol-"Schutzes" zu einer irreversiblen Reaktion und fast vollständigen Absättigung der für Phenoxybenzamin möglichen Bindungsstellen am Präparat. Die zweite Phenoxybenzaminbehandlung trifft folglich ein mit Phenoxybenzamin nahezu abgesättigtes Organ.
Die Reaktion des Rezeptorproteins mit den Agonisten Carbachol führt, wie bereits in Abschnitt 2.1.3. ausführlich dargelegt, zu einer Änderung der Konformation des Rezeptors. Dies konnte zwar für das Rezeptorprotein am glatten Muskel noch nicht eindeutig experimentell gezeigt werden, es muß jedoch aus der Vielzahl der in der Literatur beschriebenen Experimente an anderen Rezeptoren und Proteinen und der Einheitlichkeit der belebten Materie als Tatsache gelten.

Bezüglich der vorgestellten Versuchsergebnisse bedeutet dies, daß das Rezeptorprotein im Ruhezustand (Versuch A) durch Phenoxybenzamin in einen Konformationszustand fixiert wird, der unter Agonistenwirkung nicht mehr in der Lage ist, effektauslösend auf das System einzuwirken. Andererseits wird unter Carbachol-"Sättigung" (Versuch B) eine bestimmte Fraktion von Rezeptoren zum Zeitpunkt der Reaktion mit Phenoxybenzamin gerade in Carbachol-gebundenen (zweiten) Konformationszustand vorliegen und durch die Phenoxybenzaminbindung in einen Konformationszustand fixiert, der durch Agonisten noch einen Effekt am glattmuskulären System im Sinne einer Kontraktion auslöst.
Die FURCHGOTTschen Hypothesen der Blockade der Agonist-Bindungsstelle durch ß-Haloalkylamine wird damit unhaltbar.
Die ß-Haloalkylamine sind keine irreversiblen "kompetitiven" Antagonisten.
Die Bedeutung dieses Ergebnisses für die FURCHGOTTsche Methode zur Bestimmung der scheinbaren Dissoziationskonstante (Abschnitt 2.2.2.) soll im folgenden Abschnitt noch ausführlich diskutiert werden.

a) n	Experiment A -log q	Experiment B -log q		b) n	Experiment A -log q	Experiment B -log q	
1	1.260	1.097	0.163	1	2.201	1.103	0.10[illegible]
2	1.456	1.356	0.100	2	1.96[illegible]	1.76	0.00[illegible]
3	2.045	1.657	0.388	3	2.149	3.376	0.773
4	2.397	1.456	0.941	4	1.857	1.717	0.140
5	1.097	0.870	0.227	5	3.041	2.605	0.436
6	2.252	1.161	1.091	6	2.252	0.845	1.407
				7	1.370	1.447	-0.047
	$\Delta = 0.485$ N log $0.485 = 3.05$				$\Delta = 0.427$ N log $0.427 = 2.7$		

Tabelle 4

a) und b) entsprechen zwei zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführten Versuchsreihen von n = 6 (a) und n = 7 (b) Versuchen zur Bestimmung der Fraktion q (= Fraktion der [illegible] zeptoren).
Weitere Erklärung siehe Text.

4. Generaldiskussion

Der pharmakologische Rezeptor ist in seiner Gesamtheit schwer zu definieren. Er stellt die Struktur der Zelle dar, die in der Lage ist, mit einem Pharmakonmolekül spezifisch zu reagieren und, abhängig von den Eigenschaften des Pharmakonmoleküls, mittelbar oder unmittelbar einen Effekt auf das Biosystem zu übertragen.
Doch schon die Frage, wie bindet sich ein Pharmakon an den Rezeptor, ist nicht ohne weiteres zu beantworten. Im Abschnitt 2.1.3. konnte gezeigt werden, daß eine für ein Pharmakon zum Rezeptor ermittelte Affinität durch die verschiedensten Einflüsse, wie Zugabe von Lokalanästhetika, Ca^{2+}-Ionen oder auch allein durch die Agonist-Konzentration verändert werden kann.
Auch die Frage der Effektauslösung, die in den Rezeptortheorien immer mit wenig über tatsächliche Vorgänge aussagenden Begriffen wie "efficacy", "intrinsic activity" oder "intrinsic efficacy" ausgedrückt und als Eigenschaft des Pharmakons hingestellt wird, ist problematisch.
So ist z. B. noch unklar, warum Hexamethonium, am nikotinartigen Azetylcholinrezeptor des Küken -M. biventer cervicis ein Antagonist zum Azetylcholin, nach Behandlung mit Dithiothreitol (73) eine "efficacy" bekommt und zum Agonisten wird.
Ein weiteres Problem sind die kompetitiven Antagonisten. Es wird immer behauptet, Agonisten und kompetitive Antagonisten reagieren am Rezeptor an der gleichen Bindungsstelle. Sehr viele Antagonisten sind jedoch wesentlich größere Moleküle als die üblichen Agonisten. Sie müssen also mit einem wesentlich größeren Areal am Rezeptor in Wechselwirkung treten.
Daraus entsteht die Frage, mit der z. Z. auch CHANGEUX et al. (149) beschäftigt sind: Müssen Agonisten und Anta-

gonisten überhaupt an einen gemeinsamen Rezeptor reagieren? Ein echtes Kompetitionsprinzip liegt auch bei Atropin gegenüber Azetylcholin nicht vor, einem fast als klassisch zu bezeichnenden kompetitiven Antagonisten, dessen Kinetik sich allerdings widersprüchlich zu einem echten Kompetitionsprinzip verhält. Dosis-Wirkungs-Kurven für kompetitive Hemmung können auch bei verschiedenen Bindungsorten für Agonisten und Antagonisten am Rezeptorprotein erklärt werden.
Dies gilt auch für die ß-Halogenalkylamine, deren Wirkung durch eine Rechtsverschiebung der Agonist-Dosis-Wirkungs-Kurve auf einen "kompetitiven" Mechanismus (in diesem Falle irreversibel) schließen ließ, allerdings nur bei Nichtbeachtung des Überganges der Dosis-Wirkungs-Kurven von einem in den meisten Fällen ursprünglich sigmoiden zum hyperbolen Verlauf (103), einen Hinweis auf Verlust der positiven Kooperativität.

latorischen Proteinen werden im Abschnitt 2.1.3. gezeigt. Die Rezeptortheorien betrachten stets zellumbrandständige Rezeptoren, bei denen es in der Regel einfach ist, nach erfolgter Applikation von Agonisten einen physiologischen Effekt zu beobachten. Der beobachtete Effekt ist in den meisten Fällen die Muskelkontraktion, ein in allen Einzelheiten schwer zu überschauendes System von regulierenden Vorgängen (70, 109). Nur eine kleine Auswahl von Rezeptoren läßt sich mit dieser Methode untersuchen (20, 41, 117, 186, 187).
Die Reaktion von Agonisten mit den Rezeptoren der Muskelzelle führt zu elektrischen Phänomenen an der Membran und zur mechanischen Antwort. Trotz der normalerweise vorhandenen Korrelation beider Phänomene kann am glatten Muskel die Kontraktion auch bei ständig depolarisierter Membran (K⁺-Depolarisation) durch [illegible] tor oder Histaminrezeptor eine Kontraktion hervorgerufen werden (53). Andererseits führt am Skelettmuskel unter

Dekamethonium, einer depolarisierenden [illegible], nach erfolgter Repolarisation die Membran [illegible] zum mechanischen Effekt.
Die Rezeptortheorien kommen mit einer sehr begrenzten Zahl von Parametern aus, um die Beziehung zwischen einer gegebenen Pharmakonkonzentration und dem durch das Pharmakon hervorgerufenen Effekt zu beschreiben.
Die prinzipiellen Reaktionsweisen verschiedener Pharmakon-Rezeptor-Systeme können also nicht wesentlich voneinander unterschieden sein, sie müssen auf gemeinsamen Mechanismen beruhen. So ist es unwahrscheinlich, daß die Zelle für jeden auf ihrer Membran vorhandenen Rezeptortyp einen speziellen Effektuierungsmechanismus besitzt. Wahrscheinlicher ist, daß die spezifischen Rezeptorproteine zwar strukturell unterschiedlich aufgebaut und angeordnet sind und auf unterschiedliche Pharmaka unterschiedlich reagieren, ihre Reaktionsweisen aber prinzipiell gleichen Gesetzmäßigkeiten unterliegen. In diese Betrachtung paßt auch das Konzept von den frei in oder auf der Zellmembran beweglichen Rezeptoren (30).
Die Aussagen der Rezeptortheorien sind von allgemeinem Charakter und auf eine große Zahl von Rezeptortypen anwendbar.
Grundsätzlich gilt für die Reaktion von Agonisten oder kompetitiven Antagonisten mit dem Rezeptor das Massenwirkungsgesetz; für die Pharmakon-Rezeptor-Komplexe existiert eine Dissoziationskonstante.
Komplizierend auf die Bestimmung einer solchen Dissoziationskonstante am isolierten Organ und auch am Rezeptor in situ wirken sich das kooperative Verhalten der Agonisten-Bindung und die Möglichkeit des Vorliegens verschiedener Konformationszustände der einzelnen Rezeptorproteine oder verschiedenen Affinitäten zum Pharmakon aus.
Dem isolierten Rezeptorprotein hingegen wurde die Möglichkeit genommen, einen Effekt auszulösen. Um so erstaun-

Lieber ist es, daß auch am isolierten Azetylcholin-Rezeptor Kooperativität der Azetylcholin-Bindung und das Phänomen der "Desensibilisierung" gezeigt werden konnten.
Die am lebenden Präparat gemessene Dissoziationskonstante kann also zunächst nur ein scheinbarer Wert sein, der im Gegensatz zur Chemie nicht einfach als $K_A = k_2/k_1$ definiert werden kann. Dieses Problem ist in Abschnitt 2.2. ausführlich besprochen worden.
Wie in Abschnitt 3.2. experimentell gezeigt werden konnte, wirkt das Phenoxybenzamin jedoch nicht als irreversibler "kompetitiver" Antagonist, sondern es reagiert mit von der Agonist-Bindungsstelle unterschiedenen Reaktionsorten des Rezeptors.
$[R]_T$ wird folglich nicht durch Blockade der Agonist-Bindungsstellen reduziert, sondern durch eine Fixation der Rezeptoren in einen Zustand, der für die Effektauslösung "blockiert" ist.
Über die Möglichkeit einer Agonist-Bindung solcher "blockierter" Rezeptoren kann anhand der durchgeführten Versuche nichts ausgesagt werden.
Der durch ß-Haloalkylamine verringerte Agonist-Effekt am glattmuskulären Präparat, der sich aus

$$\frac{E'_A}{E'_M} = f\left(q \cdot e \cdot \frac{[A']}{K_A + [A']}\right) \qquad \text{Gl. (22)}$$

zusammensetzt, ist nicht als Folge einer "reinen" Reduktion der Agonist-Bindungsorte zu verstehen, sondern auch als eine Veränderung der Möglichkeit des Agonisten, einen Effekt auszulösen.
Diese Fähigkeit des Agonisten, einen Effekt auszulösen, wurde zuerst von STEPHENSON (1956) und dann von FURCHGOTT (59) als "efficacy" bezeichnet.

das bedeutet, daß auch bei der FURCHGOTTschen Methode zur Bestimmung der scheinbaren Dissoziationskonstante die "efficacy" verringert wird.
Im Abschnitt 2.2.6. wurde theoretisch und in Abschnitt 3.1. experimentell bewiesen, daß es zur Bestimmung der scheinbaren Dissoziationskonstante keine Rolle spielt, welcher Parameter verändert wird, um den anschließenden Dosis-Vergleich durchzuführen.
In dieser Arbeit wurde das Phänomen der unspezifischen Desensibilisierung experimentell genutzt, um auf dieser Basis eine neue Methode der Bestimmung der scheinbaren K_A zu erarbeiten.
Das Verfahren läßt sich theoretisch dann anwenden, wenn der Agonist eine Desensibilisierung hervorruft.
Es hat den Vorteil, daß zur Bestimmung scheinbarer Dissoziationskonstanten von vollaktiven Agonisten keine irreversiblen Hemmstoffe benötigt werden und ermöglicht damit die Bestimmung scheinbarer Dissoziationskonstanten an Agonist-Rezeptor-Systemen, für die solche nicht bekannt sind.
Es ist, gemeinsam mit den theoretischen Betrachtungen im Abschnitt 2.2.6., in der Lage zu beweisen, daß die klassische FURCHGOTTsche Bestimmungsmethode trotz des allosterischen Angriffes der 3-Halogenalkylamine, praktisch richtige Ergebnisse liefern muß.
Durch den Beweis der Gleichgültigkeit des variierten Parameters (ε oder $[R]_T$) erweitern sich auch die Einsatzmöglichkeiten des FURCHGOTTschen Verfahrens.
Man kann irreversible Hemmer einsetzen, von denen man von vorn herein weiß, daß sie nicht an der Agonist-Bindungsstelle reagieren, sondern auf irgendeine andere Weise die "efficacy" des Agonisten verringern.

5. Zusammenfassung

Ausgehend von einer Literaturübersicht der Rezeptortheorien wurden alle gebräuchlichen Verfahren zur [illegible] am pharmakologischen Rezeptoren isolierter Organe zusammengestellt.
Eine theoretische Betrachtung dieser Verfahren führte zu dem Postulat, daß es theoretisch gleichgültig sei, ob zur Bestimmung von K_A die totale Rezeptorkonzentration oder die "efficacy" variiert wird.
[illegible] nisten (Carbachol am Ratten-Ileum) verwendet und keinen Antagonisten benötigt.
Diese Methode und eine Versuchsserie, die einen von der [illegible] punkt der β-Haloalkylamine beweist, bestätigen das aus den theoretischen Betrachtungen abgeleitete Postulat.

AGARWAL, S.L. and S.T. HARVEY
J. Pharmac. 117 (1956) 106

ARIENS, E.J.
Arch. int. Pharmacodyn. 99 (1954) 32

ARIENS, E.J.
in:"Molecular Pharmacology", Vol. 1, ed. E.J. ARIENS, Academic Press, New York and London (1964)

ARIENS, E.J.
in: "Molecular Pharmacology", Vol. 2, ed. E.J. ARIENS, Academic Press, New York and London (1964)

ARIENS, E.J.
Arzneim.-forsch. 16 (1966) 1376

ARIENS, E.J.
Adv. Drug Res. 3 (1966) 235

ARIENS, E.J. and W.M. de GROOT
Arch. int. Pharmacodyn. 99 (1954) 193

ARIENS, E.J. and J.M. van ROSSUM
Arch. int. Pharmacodyn. 110 (1957) 275

ARIENS, E.J. and J.M. van ROSSUM
Arch. int. Pharmacodyn. 113 (1957) 89

ARIENS, E.J., J.M. van ROSSUM and P.G. KOOPMAN
Arch. int. Pharmacodyn. 127 (1960) 459

ARIENS, E.J., J.M. van ROSSUM and A.M. SIMONIS
Arzneim.-forsch. 6 (1956) 282

12 ARIENS, E.J., J.M. van ROSSUM and A.M. SIMONIS
Arzneim.-forsch. 6 (1956) 611

13 ARIENS, E.J., J.M. van ROSSUM and A.M. SIMONIS
Arzneim.-forsch. 6 (1956) 737

14 ARIENS, E.J., J.M. van ROSSUM and A.M. SIMONIS
Pharmac. Rev. 9 (1957) 218

15 ARIENS, E.J. and A.M. SIMONIS
Arch. int. Pharmacodyn. 92 (1954) 175

16 ARIENS, E.J., A.M. SIMONIS and W.M. de GROOT
Arch. int. Pharmacodyn. 100 (1955) 293

17 ARUNLAKSHANA, O. and H.O. SCHILD
Br. J. Pharmac. 14 (1959) 48

18 BARLOW, R.B., N.C. SCOTT and R.P. STEPHENSON
Br. J. Pharmac. Chemother. 31 (1967) 188

19 BARSOUM, G.S. and J.H. GADDUM
J. Physiol. (Lond.) 85 (1935) 1

20 BAULIEU, E.E., A. ALBERGA, J. Jung, M.C. LEBEAU,
C. MERCIER-BODARD, E. MILGROM, J.P. RAYNAND,
C. RAYNAND-JAMMET, H. ROCHEFORT, H. TRUONG-RICHARD-FOY,
P. ROBEL
Rec. Progr. Hormone Res. 27 (1971) 351

21 BELLAU, B.
Adv. Drug Res. 2 (1965) 89

22 BEN-HAIM, D., E.H. LANDAU and I. SIMAN
J. Physiol., (Lond.) 234 (1973) 305

22a BERGMANN, J. Vortrag zum "Bucher Kolloquium",
Berlin-Friedrichsfelde, 1974

23 BRINK, F.G. van
Arznein.-forsch. 16 (1966) 1403

24 BURGEN, A.S.V.
Br. J. Pharmac. Chemother. 25 (1965) 4

BURGEN, A.S.V.
J. Pharm. Pharmac. 18 (1966) 137

26 BURGEN, A.S.V. and L. SPERO
Br. J. Pharmac. Chemother. 34 (1968) 99

27 CANTONI, G.L. and G. EASTMAN
J. Pharmac. Exp. Ther. 87 (1946) 392

28 CHANG, C.C. and D.J. TRIGGLE
J. theor. Biol. 40 (1973) 125

CHANG, C.C. and D.J. TRIGGLE
J. theor. Biol. 40 (1973) 155

30 CHANG, C.C. and L.H. HUNG
Europ. J. Pharmac. 26 (1974) 355

31 CHANGEUX, J.-P., R. BLUMENTHAL, M. KASAI and T.R. PODLESKI
in: "Molecular Properties of Drug Receptors", ed. R. PORTER and M. O'CONNOR, CHURCHILL, London (1970) pp. 197 - 214

32 CHANGEUX, J.-P., M. KASAI and C.Y. LEE
Proc. nat. Acad. Sci., U.S.A. 67 (1970) 1241

33 CHANEUX, J.P., J.-C. MEUNIER and M. HUCHET
Mol. Pharmac. 7 (1971) 538

34 CHANGEUX, J.-P., T.R. PODLESKI and L. VOFSEY
Proc. nat. Acad. Sci., U.S.A. 58 (1967) 2063

35 CLARK, A.J.
J. Physiol., Lond. 61 (1926) 547

36 CLARK, A.J.
in: "Handbuch der experimentellen Pharmakologie", Bd. 4 "General Pharmacology", ed. W. HEUBNER und J. SCHÜLLER, Verlag von Julius Springer, Berlin (1937)

CLARK, A.J. and J. RAVENTOS
Quart. J. exp. Physiol. 26 (1937)

CLELAND, W. W.
Biochemistry, N.Y. 2 (1964) 480

COHEN, J.B. and J.-P. CHANGEUX
Biochemistry, 12 (1973) 4855

40 COHEN, J.B. and J.-P. CHANGEUX
Ann. Rev. Pharmac. 15 (1975) 83

41 COHEN, J.B., M. WEBER and J.-P. CHANGEUX
Mol. Pharmac. 10 (1974) 904

42 CRUM BROWN, A. and T.R. FRASER
Trans. R. soc. Edinb. 25 (1869) 151
zit. bei (3)

43 DALE, H.H.
J. Physiol. Lond. 34 (1906) 163

44 DEL CASTILLO, J. and B. KATZ
J. Physiol., Lond. 128 (1955) 157

45 De ROBERTIS, E.
Science 171 (1971) 963

46 DE ROBERTIS, E., G.S. LOTT and J.L. [illegible]
Mol. Pharmac. 7 (1971) 97

47 DEXTER, D.D. and B.V. [illegible]
Nature, New Biol. 235 (1972) 37

[illegible] DIAMOND, J. and R. MILEDI
J. Physiol., Lond. 162 (1962) 393

[illegible] EHRLICH, P.
Lancet (1913) 445, Zit. in (36)

50 ELDEFRAWI, M.E. and A.T. ELDEFRAWI
Biochem. Pharmac. 22 (1973) 3145

51 ELDEFRAWI, M.E., A.T. ELDEFRAWI and R.D. O'BRIEN
Proc. nat. Acad. Sci, U.S.A. 68 (1971) 1047

52 EPSTEIN, R. and H. GRUNDFEST
J. gen. Physiol. 56 (1970) 33

53 EVANS, D.H.L. and H.O. SCOTT
Nature, Lond. 180 (1957) 341

54 FASTIER, F.N., R.D. PURVES and K.M. TAYLOR
Br. J. Pharmac. 49 (1973) 490

55 FULPIUS, B.W., R.F. KOTT, D. COOPER and E. REICH
in: "Pharmacology and Future of Man", Proc. 5th Int. Congr. Pharmac., San Francisco 1972, Vol. 5 pp. 65 - 80, Karger, Basel (1973)

56 FURCHGOTT, R.F.
J. Pharmac. 111 (1954) 265

[illegible] FURCHGOTT, R.F.
Pharmac. Rev. 7 (1955) 183

FURCHGOTT, R.F.
Pharmac. Rev. 11 (1959) 429

59 FURCHGOTT, R.F.
Adv. Drug Res. 3 (1966) 21

60 FURCHGOTT, R.F.
Fed. Proc. 29 (1970) 1352

61 FURCHGOTT, R.F. and P. BURSZTAJN
Ann. N.Y. Acad. Sci. 144 (1967) 882

62 GADDUM, J.H.
J. Physiol., Lond. 61 (1926) 141

63 GADDUM, J.H.
Proc. roy. Soc., Ser. B. 121 (1937) 598

64 GADDUM, J.H.
J. Physiol., Lond. 89 (1937) 7-9 P

65 GADDUM, J.H.
Br. J. Pharmac. 8 (1953) 321

66 GADDUM, J.H.
Pharmac. Rev. 9 (1957) 211

67 GADDUM, J.H., K.A. HAMEED, D.E. HATHWAY and F.F. STEPHENS
Quart. J. exp. Physiol. 40 (1955) 49

68 [illegible]
Europ. J. Pharmac. 16 (1971) 209

69 GILL, E.W.
Progr. Med. Chem. 4 (1965) 39

70 HAFFNER, J.F.W.
Acta pharmac. et toxicol. 33 (1973) 23

71 HARVEY, A.L. and W.F. DRYDEN
Europ. J. Pharmac. 27 (1974) 5

72 HARVEY, A.L. and W.F. DRYDEN
Europ. J. Pharmac. 29 (1974) 129

73 HARVEY, A.L. and W.F. DRYDEN
Biochem. Pharmac. 23 (1974) 3099

74 HARVEY, S.C. and M. NICKERSON
J. Pharmac. 109 (1953) 325

75 HARVEY, S.C. and M. NICKERSON
J. Pharmac. 112 (1954) 274

76 HIGHAM, H.B., T.R. PODLESKI and E. BARTELS
Biochim. Biophys. Acta 75 (1963) 187

HOROWITZ, R.M. and M. NICKERSON
Fed. Proc. 13 (1954) 367

78 HURWITZ, L., W. HUBBARD and S. LITTLE
J. Pharmac. Exp. Ther. 183 (1972) 117

79 JACOB, L.S. and A. GERO
Arch. int. Pharmacodyn. 204 (1973) 306

JENKINSON, D.J.
J. Physiol., Lond. 152 (1960) 309

81 JENSEN, E.V., E.R. DE SOMBRE and P.W. JUNGBLUT
in: "Hormonal Steroids", ed. L. MARTINI, F. FRASCHINI and M. MOTTA, Excerpta Medica Fndt., Amsterdam (1967)

82 JOHANSSON, B.
Fed. Proc. 33 (1974) 121

83 JOHANSSON, B.
J. Pharmac. Exp. Ther. 190 (1972) 636

JOINER, P.D.
J. Pharmac. Exp. Ther. 186 (1973) 552

JUNG, F.
Acta biol. med. germ. 20 (1968) 360

JUNG, F.
persönliche Mitteilung (1974)

87 KALDERON, N. and I. SIMAN
Israel J. Chem. 9 (1971) 12 BC

88 KARLIN, A.
J. theor. Biol. 16 (1967) 306

89 KARLIN, A.
in: "Pharmacology and Future of Man", Proc. 5 th int. Congr. Pharmac., San Francisco 1972, Vol. 5, pp. 86 - 97, Karger, Basel (1973)

90 KARLIN, A. and E. BARTELS
Biochim. Biophys. Acta (1966) 525

91 KARLIN, A. and D. COWBURN
Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A. 70 (1973) 3636

92 KASAI, M. and J.-P. CHANGEUX
J. Membrane Biol. 6 (1971) 1

93 KASAI, M. and J.-P. CHANGEUX
J. Membrane Biol. 6 (1971) 24

94 KASAI, M. and J.-P. CHANGEUX
J. Membrane Biol. 6 (1971) 5

95 KASAI, M., J.-P. CHANGEUX and L. [illegible]
Biochem. Biophys. Res. Comm. 36 (1969) 429

96 KATZ, B.
in: "Nerve, Muscle and Synapse", Mc Graw Hill, New York (1966)

97 KATZ, B. and R. MILEDI
J. Physiol., Lond. 156 (1961) 24 p

98 KATZ, B. and R. MILEDI
J. Physiol., Lond. 170 (1964) 389

99 KATZ, B. and S. THESLEFF
J. Physiol., Lond. 138 (1957) 63

100 KIEFER, H., J. LINDSTROM, E.S. LENNOX and S.J. SINGER
Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A. 67 (1970) 1603

101 KOELLE, G.B.
J. Pharmac. 93 (1946) 232

102 KUHNEN-CLAUSSEN, D.
Toxicol. appl. Pharmac. 23 (1970) 443

103 KUHNEN-CLAUSSEN, D.
FEBS-Lett. 39 (1974) 61

104 LANDAU, E.M. and D. BEN-HAIM
Science 185 (1974) 944

105 [illegible]
J. Physiol., Lond. 33 (105) 374

106 LANGMUIR, I.
J. Amer. chem. Soc. 40 (1918) 1361

107 LEVITZKI, A.
J. theor. Biol. 44 (1974) 367

108 LINEWEAVER, H. and D. BURK
J. Amer. chem. Soc. 56 (1934) 658

109 LOEWE, S.
Pharmac. Rev. 9 (1957) 237

110 LÜLLMANN, H. and A. ZIEGLER
Naunyn-Schmiedeb. Arch. Pharmac. 280 (1973) 1

111 MACKAY, D.
Adv. Drug Res. 3 (1966) 1

112 MAHAZANEK, L.G. and F. VYSKOCIL
in: "Drug Receptors", ed. H.P. RANG, pp 105 - 119
Macmillan, London (1973)

113 MENDEZ, R.
J. Pharmac. Exp. Ther. 32 (1928) 451

114 MEUNIER, J.-C. and J.-P. CHANGEUX
FEBS-Lett. 32 (1973) 143

115 MEUNIER, J.-C., H. SUGIYAMA, J. CARTAND,
R. SEALOCK and J.-P. CHANGEUX
Brain Res. 62 (1973) 307

116 MILEDI, R., P. MOLUMOFF and L.T. POTTER
Nature, Lond. 229 (1971) 554

117 LILGROK, E., H. LOU YEH and E.E. BALDWIN
Karolinska Symposia on Research Methods in reproductive Endocrinology, 6 th Symposium, "Protein Synthesis in Reproductive Tissue" (1973)

118 MITTAG, T.W. and A. TORMAY
Fed. Proc. 29 (1970) 547

119 MONOD, J., J.-P. CHANGEUX and F JACOB
J. mol. Biol. 6 (1963) 306

120 MONOD, J., J. WYMAN and J.-P. CHANGEUX
J. mol. Biol. 12 (1965) 88

121 MORGENSTERN, R.
Acta biol. med. germ. 32 (1974) K 23

122 MORGENSTERN, R. and R. WINTER
Acta biol. med. germ. 34 (1975) K1

123 NICKERSON, M.
Pharmac. Rev. 1 (1949) 27

124 NICKERSON, M.
Nature, Lond. 178 (1956) 697

125 NICKERSON, M.
Fed. Proc. 15 (1956) 463

126 NICKERSON, M.
Pharmac. Rev. 9 (1957) 246

127 NICKERSON, M.
Pharmac. Rev. 11 (1959) 443

128 NICKERSON, M. and L.S. GOODMAN
J. Pharmac. Exp. Ther. 89 (1947) 167

129 NICKERSON, M. and W.S. GUTH
J. Pharmac. Exp. Ther. 97 (1949) 25

130 NICKERSON, M. and F.R. HARRIS
Fed. Proc. 8 (1949) 321

131 NICKERSON, M., J.W. HENRY and G.M. NOMAGUCHI
J. Pharmac. Exp. Ther. 107 (1953) 300

132 NICKERSON, M. and E.R. MORTIMAL
Fed. Proc. 16 (1957) 325

133 NICKERSON, M. and G.M. NOMAGUCHI
J. Pharmac. Exp. Ther. 92 (1948) 40

134 NICKERSON, M. and G.M. NOMAGUCHI
J. Pharmac. Exp. Ther. 95 (1949) 1

135 NICKERSON, M. and G.M. NOMAGUCHI
J. Pharmac. Exp. Ther. 101 (1951) 379

136 O'BRIEN, R.D., M.E. ELDEFRAWI and A.T ELDEFRAWI
Ann. Rev. Pharmac. 12 (1972) 19

137 OLSEN, R., R.-C. MEUNIER, M. WEBER and J.-P. CHANGEUX
in: "Pharmacology and Future of Man", Proc. 5 th int. Congr. Pharmac., San Francisco 1972, Vol. 5 pp. 113 - 125, Karger, Basel (1973)

138 PARKER, R.B.
J. Pharmac. Exp. Ther. 180 (1972) 62

139 PARKER, R.B. and D.R. WAUD
J. Pharmac. Exp. Ther. 177 (1971) 1

140 PATON, W.D.M.
Proc. roy. Soc., Ser. B. 154 (1961) 21

141 PATON, W.D.M.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 139 (1967) 632

142 PATON, W.D.M. and W.L.M. PERRY
J. Physiol., Lond. 119 (1953) 43

143 PATON, W.D.M. and H.P. RANG
Proc. roy. Soc., Ser. B 163 (1965) 1

144 PATON, W.D.M. and H.P. RANG
Adv. Drug. Res. 2 (1966) 57

[illegible] PATON, W.D.M. and D.R. WAUD
Arch. exp. Pathol. Pharmac. 246 (1964) 124

[illegible] PATON, W.D.M. and D.R. WAUD
J. Physiol., Lond. 191 (1967) 59

147 PODLESKI, T.R. and J.-P. CHANGEUX
in: "Fundamental Concepts in Drug-Receptor Interactions" ed. J.F. DANIELLI, J.F. MORAN and D.J. TRIGGLE, pp 261, Academic Press, New York and London (1970)

148 PODLESKI, T.R., J.-C. MEUNIER and J.-P. CHANGEUX
Proc. nat. Acad. Sci., U.S.A. 63 (1969) 1239

149 POPOT, J.L.
persönliche Mitteilung (1975)

150 RANG, H.-P.
Proc. roy. Soc., Ser. B. 164 (1966) 488

151 RANG, H.-P.
in: "Pharmacology and Future of Man", Proc. 5 th int. Congr. Pharmac., San Francisco 1972, Vol. 5, pp. 113 - 116, Karger, Basel (1973)

152 RANG, H.-P. and J.M. RITTER
Mol. Pharmac. 5 (1969) 394

153 RANG, H.P. and J.M. RITTER
Proc. V. int. Meet. Neurobiol. Oslo 1969, pp. 137-143, Oslo University Press (1970)

154 RANG, H.-P. and J.M. RITTER
Mol. Pharmac. 6 (1970) 357

155 RANG, H.-P. and J.M. RITTER
Mol. Pharmac. 6 (1970) 39[illegible]

156 RANG, H.-P. and J.M. RITTER
Mol. Pharmac. 7 (1971) 620

157 RIOUX, F., W.K. PARK and D. HEROLT
Canad. J. Physiol. Pharmac. 51 (1973) 665

158 ROCHA E SILVA, M.
Pharmac. Rev. 9 (1957) 259

159 ROCHA E SILVA, M. and W.E. RORATO
J. Pharmac. Exp. Ther. 93 (1948)457

160 ROSSUM, J.M. van
Arzneim.-forsch. 16 (1966) 1412

161 ROSSUM, J.M. van
Adv. Drug Res. 3 (1966) 189

ROSSUM, J.M. van and M.J. ARIENS
Arch. int. Pharmacodyn. 110 (1957) 2[illegible]

ROSSUM, J.M. van and E.J. ARIENS
Arch. int. Pharmacodyn. 136 (1962) 385

ROSSUM, J.M. van and F.G. van de BRINK
Arch. int. Pharmacodyn. 143 (1963) 240

165 ROTHLIN, E., H. KONZETT and A. GERLEMT,
J. Pharmac. Exp. Ther. 112 (1954) 135

166 [illegible]
Proc. roy. Soc., Ser. B. 115 (1934) 451

ROUGHTON, F.J.W., A.B. OTIS and R.L.J. LYSTER
Proc. roy. Soc., Ser. B. 144 (1955) 29

RUBIN, M. and J.-P. CHANGEUX
J. mol. Biol. 21 (1966) 265

SASTRY, B.V.R. and H.C. CHENG
J. Pharmac. Exp. Ther. 180 (1972) 326

170 SCHILD, H.O.
Br. J. Pharmac. Chemother. 2 (1947) 189

171 SCHILD, H.O.
Br. J. Pharmac. Chemother. 2 (1947) 251

172 SCHILD, H.O.
Br. J. Pharmac. Chemother. 4 (1949) 277

173 SCHILD, H.O.
Pharmac. Rev. 9 (1957) 242

174 SCHILD, H.O.
Br. J. Pharmac. 49 (1973) 718

175 SHACKELL, L.F., W. WILLIAMSON, M.M. HEINEMAN, G.M. KATZMAN and B.S. KLEINMAN
J. Pharmac. 24 (1924) 53

176 SIMONIS, A.M. and E.J. ARIENS
Arzneim.-forsch. 16 (1966) 1393

177 SINGER, S.J. and G.L. NICOLSON
Science 175 (1972) 720

178 STEPHENSON, R.P.
Br. J. Pharmac. Chemother. 11 (1956) 379

179 STRYER, L.
in: "Molecular Properties of Drug Receptors"
ed. R. PORTER and M. O'CONNOR, pp. 133-150,
Churchill, London (1970)

180 SUGIYAMA, H., J.L. POPOT, J.B. COHEN, M.WEBER and J.-P. CHANGEUX
in: "Protein-Ligand Interactions", pp. 289-302
Walter de Gruyter and Co., Berlin (1975)

181 TAKEUCHI, A. and N. TAKEUCHI
J. Physiol., Lond. 205 (1060) 377

182 TAYLOR, D.B.
J. Pharmac. Exp. Ther. 186 (1973) 537

183 THESLEFF, S.
in: "Molecular Properties of Drug Receptors",
ed. R. PORTER and M. O'CONNOR, pp. 33-39
Churchill, London (1970)

184 THRON, D.C.
Mol. Pharmac. 9 (1973) 1

[illegible] TAYLOR, D.C. and D.R. MAUD
J. Pharmac. Exp. Ther. 160 (1968) 11

[illegible] TRUONG, K., C. GUINET, C. LILLIET, O. SOULIGNAC, R. BUCOURT, M. THIRAN, V. TORELLI and E.-E. BAULIEU
FEBS-Lett. 35 (1973) 289

[illegible] VON WITTPAAR, B. and C.G. MUELLER
Biochim. biophys. Acta 176 (1969) 626

[illegible] WASER, P.G., A. HOFMANN, H.C. SCHAUB, W. HOPFF, J.H. KARIS, G. ROSEN and A. CHANG
in: "Pharmacology and Future of Man", Proc. 5 th int. Congr. Pharmac., San Francisco 1972, Vol. 5, pp 90-112, Karger, Basel (1973)

[illegible] MAUD, D.R.
Nature, 196 (1962) 1107

[illegible] MAUD, D.R.
J. Pharmac. Exp. Ther. 15[illegible] (1967) [illegible]

191 MAUD, D.R.
Pharmac. Rev. 20 (1968) 49

[illegible] MAUD, D.R.
J. Pharmac. Exp. Ther. 170 (1969) 117

[illegible] MAUD, D.R. and R.B. PARKER
J. Pharmac. Exp. Ther. 177 (1971) 13

[illegible] WEBB, R.L.
Br. J. Pharmac. 5 (1950) 335

J. LA COUR and DU CAILAR
Mol. Pharmac. 7 (1971) 530

Tabelle 1: [illegible] an verschiedenen glattmuskulären Organen

Agonist	Präparat	Methode	K_A [M]		
Methylnoradrenalin	[illegible] Magenstreifen	Dibenamin	$(2{,}08 \pm 0{,}24) \cdot 10^{-6}$ (12)		(6)
	[illegible]	Dibenamin	$1{,}6 \cdot 10^{-5}$		(101)
	Aortenstreifen	[illegible]	[illegible]		(61)
	li. Atrium von [illegible]	[illegible]	[illegible]		(61)
	[illegible] kol vom Meer- [illegible]	Dibenamin	$(1{,}03 \pm 0{,}21) \cdot 10^{-6}$ (26)		(10)
Noradrenalin	[illegible]	Dibenamin	(1,59 ± 0,24[illegible] (10)		(61)
	[illegible]	Dibenamin	[illegible]		(61)
	li. Atrium von [illegible]	Dibenamin	$1{,}66 \cdot 10^{-5}$		(61)

Tabelle 1 (Fortsetzung)

Agonist	Präparat	Inhibitor	K_A [B]	(n)	K_A [B]	Literatur
Carbachol	[illegible] Ringmuskel	[illegible]	$1,3 \cdot 10^{-5}$; $1,1 \cdot 10^{-5}$; $1,6 \cdot 10^{-5}$			[illegible]
	Aortenstreifen vom Kaninchen	Dibenamin	$1,6 \cdot 10^{-5}$; $1,1 \cdot 10^{-5}$;			(59)
	reserpinisiertes li. Atrium v. Meerschweinchen	Dibenamin	$1,1 \cdot 10^{-5}$; $1,9 \cdot 10^{-5}$;			(59)
	Electroplax (Electrophorus [illegible]		$4,4 \cdot 10^{-5}$			(76)
Methacholin	Kaninchen- [illegible]	Dibenamin	$(2,43 \pm 0,2) \cdot 10^{-6}$	(4)		(61)
Pilocarpin	Kaninchen-Magenstreifen	Dibenamin	$(6,93 \pm 1,05) \cdot 10^{-6}$	(4)		(61)

Tabelle 1 (Fortsetzung)

Agonist	Präparat	Methode	K_B [M]	(n)	k_B [M]	Literatur
Pilocarpin	Kaninchenmagenstreifen 1 Versuch, in dem das					(61)
		als kompetit. Antagonist				
		Atropin				
	Rattendarm	Dibenamin	$1{,}6 \cdot 10^{-5}$			(161)
						(50)
	Meerschweinchen-Ileum	Dibenamin	$(9{,}4 \pm 2{,}2) \cdot 10^{-6}$	(6)		(192)
		Vergleich m. Atropin	$(4{,}4 \pm 0{,}6) \cdot 10^{-6}$	(9)		(192)
		als kompetit. Antagonist	$(2{,}1 \pm 0{,}3) \cdot 10^{-6}$	(3)		(192)
$n\text{-}C_nH_{2n+1}N^+(CH_3)_3$						
1	Meerschweinchen-Ileum	Decis-Vergleich	$2{,}4 \cdot 10^{-7}$			(176)
		Dibenamin	$1{,}9 \cdot 10^{-6}$			(161)

[illegible] (Fortsetzung)

[illegible]	[illegible]	[illegible]	K_A [M]	(n)	[illegible]
[illegible]					
C_6	Meerschweinchen-Ileum	Dosis-Vergleich	$5,26 \cdot 10^{-5}$		(17…)
	"		$2,39 \cdot 10^{-5}$		(150)
	"		$2,79 \cdot 10^{-5}$		(1…)
C_7	"		$1,59 \cdot 10^{-2}$		(17…)
	[illegible]		[illegible] $\cdot 10^{-5}$		[illegible]
	[illegible]	[illegible]	([illegible] ± 0,24) · [illegible]	([illegible])	[illegible]
	"	Vergleich [illegible] chol	$(7,1 \pm 0,15) \cdot 10^{-5}$	(12)	(192)
	"	als kompetit. [illegible]	$(3,2 \pm 0,1) \cdot 10^{-5}$	(4)	(192)
	"		$2,07 \cdot 10^{-5}$		(138)
[illegible]	[illegible]	[illegible] Vergleich	[illegible]		[illegible]
	"	k_2/k_1	$3,58 \cdot 10^{-5}$		(140)
			[illegible] $\cdot 10^{-5}$		[illegible]
	"		$1,60 \cdot 10^{-5}$		(138)

Tabelle 1 (Fortsetzung)

Agenzien	Präparation	Methode	k_1 [M]	$(n)^+$	k_2 [M]	Literatur
$C_nH_{2n+1}N^+(CH_3)_3$						
C_9	Bestrahlungen-Ionen	Dosis-Vergleich	$0,91 \cdot 10^{-3}$			(136)
	n	k_2/k_1	$1,21 \cdot 10^{-3}$			(145)
	n		$0,57 \cdot 10^{-3}$			(135)
C_{10}	n	Dosis-Vergleich	$3,5) \cdot 10^{-3}$			(134)
	n	k_2/k_1	$0,42 \cdot 10^{-5}$			(140)
	n		$0,31 \cdot 10^{-5}$			(138)
C_{11}	n	k_2/k_1	$3,17 \cdot 10^{-3}$			(140)
			$3,21 \cdot 10^{-3}$			(139)
Histamin	n	Dibromid	$1 \cdot 10^{-6}$; $1 \cdot 10^{-5}$			(59)
	n	Dihydrochlorid	$(4,19 \pm 0,37) \cdot 10^{-6}$	(10)		(10)
	n	Co^{2+} - Radiation	$(4,13 \pm 0,37) \cdot 10^{-6}$	(11)		(68)
	n	Dibromid	$3,7 \cdot 10^{-6}$			(161)

$(n)^+$: Anzahl der durchgeführten Versuche

	Elektrophorus				[illegible]
	K_{ap} (in vivo) [M]	K_{ap} (in vitro) [M]	K_r (α-Toxin) [M]	K_r [illegible]	[illegible]
Agonist					
Acetylcholin	[illegible]	—	[illegible]	[illegible]	[illegible]
Decamethonium	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
Carbachol	$3 \cdot 10^{-5}$	$4 \cdot 10^{-5}$	$4 \cdot 10^{-5}$	$5 \cdot 10^{-7}$	—
Antagonist					
d-Tubocurarin	$2 \cdot 10^{-7}$	$2 \cdot 10^{-7}$	$2 \cdot 10^{-7}$	$2 \cdot 10^{-7}$	$2 \cdot 10^{-7}$
Gallamin	$3 \cdot 10^{-7}$	$3 \cdot 10^{-7}$	$4 \cdot 10^{-7}$	$8 \cdot 10^{-6}$	[illegible]
Hexamethonium	[illegible] $\cdot 10^{-5}$	$6 \cdot 10^{-5}$	$6 \cdot 10^{-5}$	$4 \cdot 10^{-5}$	—

Tabelle 2: [illegible] in vivo und in vitro a) (40)

a) [illegible]

b) [illegible]

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. sc. med. F. Jung besonders herzlich für die wertvollen grundlegenden Anregungen, für die Vermittlung seiner Erfahrungen in der Diskussion der experimentellen Ergebnisse und seine Hinweise zur Abfassung der Arbeit.
Herrn Prof. Dr. med. habil. H. Zawadzki möchte ich für die Unterstützung bei der Realisierung meiner wissenschaftlichen Tätigkeit danken, vor allem für [illegible] fruchtbaren Arbeitsbedingungen.
Für die zahlreichen Hinweise und Ratschläge zur Abfassung der Arbeit danke ich Herrn Prof. Dr. sc. med. W. Oelßner herzlich.
Mein Dank gilt auch meiner medizinisch-technischen Assistentin, Frau Renate Winter, die mit großer Umsicht und Zuverlässigkeit einen Teil der Experimente durchführte.